



Klonierung und in vitro Transkription eines funktionellen, menschlichen 7S K RNA Gens

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

WINFRIED KRÜGER

Bochum, im Dezember 1986

Die vorliegende Arbeit entstand am
Lehrstuhl für Biochemie der Abteilung Chemie an
der Ruhr Universität Bochum.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere aber Herrn PD Dr. B. J. Benecke für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, ebenso Herrn Prof. O. Pongs für sein Interesse bei der Anfertigung dieser Arbeit und seine Unterstützung.

Besonderen Dank möchte ich Dr. D. Zöphel für seine Hilfsbereitschaft und die hilfreichen Diskussionen widmen. Ferner danke ich auch A. Baumann, R. Seidel und D. Voss für Anregungen und Ratschläge sowie K. Grabert für die Ausführung der photographischen Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	5
2.1. Herkunft der verwendeten Enzyme und Chemikalien	5
2.2. Isolierung von radioaktiv markierter und unmarkierter RNA aus Zellkulturzellen	7
2.2.1. Zellkultur und verwendete Zelllinie	7
2.2.2. Isolierung von radioaktiv markierter und radioaktiv nicht markierter RNA	7
2.2.3. Auftrennung von RNA durch Polyacrylamidgelelektrophorese	8
2.2.4. Elution diskreter RNA-Spezies aus SDS-Polyacrylamidgelen	9
2.2.5. Autoradiographie	10
2.3. Radioaktive Markierung von RNA mit ^{32}P -haltigen Verbindungen	10
2.3.1. <u>In vivo</u> Markierung von RNA mit ^{32}P -Orthophosphat	10
2.3.2. <u>In vitro</u> Markierung von RNA mit 3'-(5'- α - ^{32}P) Cytosindiphosphat	11
2.4. Isolierung von Plasmid-DNA	11
2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	11
2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab	12
2.5. Radioaktive Markierung von DNA mit ^{32}P -haltigen Verbindungen	12
2.5.1. <u>In vitro</u> Markierung von DNA mit (γ - ^{32}P)-ATP	12
2.5.2. <u>In vitro</u> Markierung von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E. Coli	13
2.5.3. <u>In vitro</u> Markierung von DNA mit DNA-Polymerase I aus E. Coli, "Nick-translation"	13
2.6. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek	13
2.6.1. <u>In vitro</u> Polyadenylierung diskreter RNA-Spezies	13
2.6.2. Synthese des ersten Stranges	14
2.6.3. Synthese des zweiten Stranges	15
2.6.4. Synthese homopolymerer Enden an Vektor- und cDNA	16
2.6.5. Klonierung der cDNA	17

2.7. Isolierung spezifischer cDNA-Klone aus einer in Plasmide klonierten cDNA-Bibliothek	18
2.7.1. Herstellung von "Master-und Replika-Filtern"	18
2.7.2. Aufbereitung der "Replika-Filter" zur Hybridisierung	19
2.7.3. Kolonienhybridisierung	19
2.7.4. Lagerung der "Master-Filter"	20
2.8. Isolierung spezifischer Klone aus einer in Bakteriophagen klonierten Genbibliothek	21
2.8.1. Handhabung der Genbibliothek	21
2.8.2. Herstellung und Aufbereitung von "Phagen-Filtern" zur Hybridisierung	22
2.8.3. Plaquehybridisierung und Handhabung der identifizierten Klone	23
2.9. Isolierung von Phagen-DNA	24
2.9.1. Herstellung eines primären Phagenlysats	24
2.9.2. Isolierung von Phagen-DNA aus primären Lysaten	24
2.9.3. Isolierung der Phagen-DNA aus großen Lysaten	25
2.10. Hybridisierungstechniken	25
2.10.1. "Dot-Blot"-Hybridisierung und "Hybridisierungs-Selektionsverfahren"	25
2.10.2. Hybridisierung nach Southern	26
2.11. Isolierung von Fragment-DNA zur Subklonierung	26
2.11.1 Restriktionsanalyse	26
2.11.2. Verdauung mit der Exonuklease Bal 31	26
2.11.3. Elution nach Tautz et al.	27
2.11.4. Elution mit NA-45 Membranen	27
2.11.5. Elution mit der "Biotrap-apparatur"	28
2.12. Klonierung in verschiedene Vektoren	28
2.12.1. Herstellung kompetenter Bakterien	28
2.12.2. Vorbereitung der Vektor-DNA und Ligation	29
2.12.3. Klonierung in die Plasmid-Vektoren pUC 8 und pAT 153	30
2.12.4. Klonierung in den Bakteriophagen M13	30
2.13. Isolierung von M13-DNA	31
2.13.1. Isolierung der M13 RF-DNA	31
2.13.2. Nachweis in M13-DNA mit unterschiedlicher Orientierung einklonierter DNA-Fragmente	31

2.13.3. Isolierung einzelsträngiger M13-DNA	31
2.14. DNA-Sequenzanalyse nach der Methode von Sanger und Nicholson	32
2.14.1 Sequenzierung nach der Methode von Sanger und Nicholson von M13-Klonen	32
2.14.2. Sequenzierung nach der Methode von Sanger und Nicholson von pUC 8-Klonen	33
2.15. <u>In vitro</u> Transkription	33
2.15.1. Präparation eines S-100 Zellextraktes	33
2.15.2. <u>In vitro</u> Transkription mit einem S-100 Zellextrakt	34
2.16. Ribonuklease T ₁ - "Fingerprints"	34
2.16.1. Inkubation von RNA mit Ribonuklease T ₁	34
2.16.2. Hochspannungselektrophorese auf Zelluloseazetat-folien	35
2.16.3. Homochromatographie	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Charakterisierung einer zur 7S K RNA homologen, genomischen DNA-Sequenz	37
3.1.1. Isolierung eines Subklons mit einer 7S K RNA-homologen Sequenz	37
3.1.2. Sequenzierung des Subklons pHK/VI	39
3.2. Isolierung eines zur 7S K RNA homologen cDNA-Klons aus einer cDNA-Bibliothek	41
3.2.1. <u>In vitro</u> Polyadenylierung der isolierten 7S K RNA	41
3.2.2. Synthese und Klonierung einer doppelsträngigen, zur 7S K RNA homologen cDNA	43
3.2.3. Differentielle Hybridisierungen der cDNA-Bibliothek	46
3.2.4. Charakterisierung eines identifizierten cDNA-Klons	49
3.3. Isolierung von 7S K RNA homologen Sequenzen aus einer menschlichen, in X-Phagen klonierten Genbibliothek	52
3.3.1. Identifizierung der zur 7S K RNA homologen Sequenzen in der Genbibliothek unter selektiven Bedingungen	52

3.3.2. <u>In vitro</u> Transkription der aus der Genbibliothek isolierten Genkandidaten	53
3.3.3. Subklonierung der Genkandidaten	56
3.4. Charakterisierung des Subklons p7SK/132	57
3.4.1. Restriktionsanalyse des Subklons p7SK/132	57
3.4.2. <u>In vitro</u> Transkription des Subklons p7SK/132	59
3.4.3. Sequenzanalyse des Plasmidsubklons p7SK/132	63
3.4.4. "Fingerprintanalyse" des <u>in vitro</u> Transkripts aus dem Klon p7SK/132	66
3.5. Einfluß verschiedener Parameter auf die Transkription des 7S K RNA Gens	
3.5.1. Abhängigkeit der Transkription des 7S K RNA Gens von der Mg^{2+} -Konzentration	68
3.5.2. Abhängigkeit der <u>in vitro</u> Transkription der 7S K RNA von der K^{+} -Konzentration	70
3.5.3. Einfluß weiterer Faktoren auf die Transkription mit einem S-100 Extrakt am Beispiel des 7S K RNA Gens	71
3.6. Einfluß verschiedener DNA-Regionen der 7S K RNA Transkriptionseinheit auf die <u>in vitro</u> Syntheserate der 7S K RNA	74
3.6.1. Sequenzhomologien in der 7S K RNA Transkriptionseinheit zu anderen RNA-Polymerase III Genen	74
3.6.2. Isolierung von Mutanten mit Deletionen im 5'-flankierenden Bereich des 7S K RNA Gens	76
3.6.3. Transkriptionsverhalten der im 5'-flankierenden Bereich des 7S K RNA Gens deletierten Sequenzen	78
3.6.4. Isolierung von Rekombinanten aus Teilen der 7S K RNA Transkriptionseinheit und des Klones pHK/VI	81
3.6.5. <u>In vitro</u> Transkription der Hybridsequenzen aus Teilen der 7S K RNA Transkriptionseinheit und des Klons pHK/VII	85
3.6.6. "Run-off" Transkription von, im 7S K RNA Gen zerlegten DNA-Fragmenten	87
4. Diskussion	90
5. Zusammenfassung	100
6. Literaturverzeichnis	101

Abkürzungen

Bis	N, N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählereignisse pro Minute
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid 5'-Triphosphat (dATP: 2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat, dCTP: 2'-Desoxycytosin 5'-Triphosphat, dGTP: 2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat, dTTP: 2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleotid 5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	"copy"-DNA
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
hnRNA	heterogene nukleare RNA
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-RNA
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleotid 5'-Triphosphat
OD	Optische Dichte
oligo(dT)	Oligodesoxythymidylsäure
Poly(A ⁺)-RNA	polyadenylierte RNA
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Phageneinheiten
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Sedimentationskoeffizient (Svedbergeinheit)
scRNA	"small cytoplasmic" RNA
SDS	Natrimdodecylsulfat
snRNA	"small nuclear" RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheiten, "Units"

1. Einleitung

Da viele der untersuchten Mechanismen zur Regulation der Genexpression mit der Transkription von Genen verbunden sind (1; Dar-nell, 1979) ist das Ziel vieler Untersuchungen hierzu, die Inter-aktion zwischen den beteiligten Komponenten auf molekularer Ebene zu analysieren.

Nach der Aufklärung einiger derartiger Mechanismen in Prokaryoten (2-5) sind heute die experimentellen Ansätze auf die Identifi-zierung der Regulationsvorgänge in Eukaryoten ausgerichtet. So lassen sich, im Gegensatz zu den Prokaryoten mit nur einem DNA-abhängigen RNA-Polymerasesystem, im Nukleus eukaryoter Zellen drei verschiedene RNA-Polymerasesysteme nachweisen (6-8), ein Viertes existiert in den Mitochondrien dieser Zellen (9).

Diese im Nukleus lokalisierten Polymerasen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Ionenbedarfes (10), sondern können sehr einfach durch ihre Sensivität bei der in vitro Transkrip-tion gegenüber α -Amanitin charakterisiert werden (11).

Jedes dieser eukaryoten Polymerasesysteme ist spezialisiert auf die Transkription einer bestimmten Gruppe von RNAs, so z. B. synthetisiert RNA-Polymerase I den 45S rRNA-Vorläufer, aus dem die 5.8S, 18S und 28S rRNA entstehen (12, 13), die alle struk-turelle Bestandteile eukaryoter Ribosomen darstellen (14). Da-neben ist diese Polymerase auch für die Erzeugung einer Gruppe von kleinen Kern-RNAs, den snPI-RNAs, verantwortlich (15). Dagegen ist RNA-Polymerase II für die Bildung der hnRNA (16) verantwortlich, aus der durch Prozessierung mRNA (13, 17-20) entsteht. Weiterhin lassen in vitro Transkriptionsstudien darauf schließen, daß sie möglicherweise auch für die Synthese der sn-RNAs U₁ bis U₆ (21, 22) verantwortlich ist (23, 24), wobei diese snRNAs sehr wahrscheinlich an der Prozessierung der hnRNA zur mRNA beteiligt sind (25-28).

Während die bis hlerhin vorgestellten Enzyme sowohl nieder- als auch hochmolekulare RNAs synthetisieren, entstehen bei der Trans-kription mit RNA-Poloymerase III ausschließlich niedermolekulare RNAs (29-32). Zu diesen gehören neben der 5S und der tRNA auch die 7S RNAs K und L sowie die 8S RNA M (29). Daneben transkri-biert dieses Enzym einige kleine RNAs viralen Ursprungs, nämlich die beiden adenoviralen VAI- und VAII-RNAs (33) sowie die ganz ähnlichen Produkte EBER I und EBER II aus dem Genom des Ebstein-Barr Virus (34).

Es existieren viele Hinweise dafür, daß diese RNA-Polymerasen in allen eukaryoten Organismen (35) auftreten, sodaß es als sehr wahrscheinlich gelten kann, daß Gene, die von derselben RNA-

Polymerase transkribiert werden, auch über einige gemeinsame Strukturen für die Interaktion mit dem jeweiligen Transkriptionssystem verfügen. Daher wird es von besonderem Interesse sein, ob derartige Strukturen zur genspezifischen Regulation durch andere ersetzt werden können oder ob mehrere gleichwertige Strukturen existieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde für solche Untersuchungen das RNA-Poloymerase III-Transkriptionssystem ausgewählt, obwohl dieses System schon als relativ gut charakterisiert gelten kann.

So weist dieses Enzym ein Molekulargewicht von etwa 650000 Da auf und besteht wahrscheinlich aus 10 oder 11 verschiedenen Untereinheiten (36-38), wobei diese Werte je nach Herkunft aus den verschiedenen Organismen zum Teil recht gravierend voneinander abweichen (39-42).

Die Gründe zur Auswahl gerade dieses System sind einfach darin zu suchen, daß alle bislang identifizierten RNA-Polymerase III-Gene nur 75 (tRNA) bis 330 bp (7S K RNA) lang sind (29, 43-45). Dadurch können mit den heute verfügbaren Methoden zur Untersuchung genomischer DNA sowohl die intakten Gene als auch die flankierenden Regionen mit einem einzigen Klon analysiert werden, sodaß nicht nur die verschiedenen Prozesse der Initiation, der Elongation und der Termination einzeln untersucht werden können, sondern auch deren Zusammenwirken. Die in einem solchen Modellsystem erhaltenen Aussagen geben möglicherweise Hinweise auf ähnliche Vorgänge bei den beiden anderen RNA-Polymerasesystemen, deren Gene sich teilweise über 200 Kb erstrecken (46).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die aufgereinigte RNA-Polymerase III allein nicht zur korrekten Transkription von 5S- oder tRNA-Genen ausreicht (47). So benötigt sie für eine exakte Initiation und Termination zusätzliche Faktoren, von denen zwei, TFIIB und TFIIC, bereits isoliert wurden (48). Diese sind offensichtlich notwendig für die Transkription der tRNA- und VAI/II-RNA Gene. Ein dritter, zusätzlicher Faktor scheint für die Transkription der 5S-RNA Gene essentiell zu sein (49). Dieser, als TFIIIA bezeichnete Faktor, gehört interessanterweise zur Klasse der sog. "Fingerproteine" (160).

Daher erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß andere RNA-Polymerase III-Gene weitere spezifische Faktoren zur exakten Transkription benötigen.

Bei den bisher untersuchten Faktoren scheint es sich aber nur um solche zu handeln, die an der Transkription mit RNA-Polymerase III mechanistisch beteiligt sind. Ob eine Regulation der Expression dieser Gene auftritt, die der ähnelt, die bei RNA-Polymerase II-Genen erfolgt, konnte bisher noch nicht geklärt werden,

da bislang nur wenige Beispiele dazu existieren (50, 51). Weitere Analysen zur Identifizierung der Promotorsequenzen für RNA-Polymerase III-Gene haben gezeigt, daß für die Transkription essentielle Sequenzen intragenisch lokalisiert sind (52-59). So ist dieser Promotor in den tRNA-Genen (52- 54), den VAI und VAII- (55, 56) und in den EBER I bzw. EBER II-Genen (34) in zwei Blöcke aufgespalten, von denen der erste, die sog. "A-Box" 6-20 bp hinter dem Initiationsbasenpaar beginnt und sich über 11-13 bp erstreckt. Die zweite Sequenz, die sog. "B-Box" folgt in einem Abstand von 30-60 bp auf die A-Box. Eine derartige Promotorstruktur zeigen auch die in vitro transkribierbaren, repetitiven Sequenzen der Alu-Familie (57, 58).

Im 5S-Gen ist dieser Promotor dagegen in einem Block lokalisiert, der 50 bp hinter dem Initiationsbasenpaar beginnt und sich über etwa 33 bp erstreckt (59, 60). Eigentümlicherweise besteht diese Sequenz aus zwei aufeinanderfolgenden "A-Boxen" und einer weiteren, direkt anschließenden "C-Box" (61).

Die Existenz des zweiten Promotortyps in den 5S-Genen führt zu der Frage, ob in anderen RNA-Polymerase III-Genen weitere Sequenzen mit ähnlicher Funktion auftreten oder ob die bislang identifizierten Promotortypen in allen diesen Genen auftreten. Parallel dazu müssen andere Untersuchungen zeigen, ob weitere, genspezifische Transkriptionsfaktoren in diesem Polymerasesystem existieren.

Zu den bisher nicht untersuchten RNA-Polymerase III-Transkriptionseinheiten gehört auch das in vorliegenden Arbeit charakterisierte Gen der 7S K RNA .

Diese 331 nt lange RNA besitzt wie alle RNA-Polymerase III-Produkte weder eine Poly(A)-Kette noch weist sie am 5'-Terminus eine "Cap-Struktur" auf (45). Auch sog. "seltene Basen" konnten in ihr nicht nachgewiesen werden. Andererseits scheint sie in den höheren, eukaryoten Organismen weit verbreitet zu sein, da sie sowohl in Insekten als auch in Säugern nachgewiesen wurde (62). Da diese RNA je nach verwendeter Extraktionsmethode sowohl aus den Zellkernen (63, 64) als auch aus der Zytoskelettfraktion des Zytoplasmas isoliert wurde (65,), konnte bisher keine Übereinkunft über die zelluläre Lokalisation dieser RNA getroffen werden. Parallel dazu ist auch die zelluläre Funktion dieser RNA ungeklärt, obwohl eine Arbeitsgruppe (66) eine kurzfristige Assoziation dieser RNA an membrangebundene Polysomen nachgewiesen hat. Dieses Ergebnis gibt gleichzeitig einen weiteren Hinweis auf ihre zytoplasmatische Lokalisation, sodaß es als gerechtfertigt erscheint, sie zur Gruppe der "scRNAs" (small, zytoplasmic RNAs) zuzurechnen. Einen weiteren Hinweis auf ihr zytoplas-

matisches Auftreten liefert ihre Verpackung in einem 13S großen Ribonukleoproteinpartikel, das ebenfalls aus dem Zytoplasma isoliert wurde (45).

Wie die vorliegende Arbeit und die im Verlauf dieser Arbeit publizierten, aus "genomischen Southern-Blots" abgeleiteten Daten einer anderen Arbeitsgruppe (43) zeigen, ist die 7S K RNA K homolog zu einer Klasse mittelrepetitiver, im Genom verteilter Sequenzen. Dabei wurde die Anzahl dieser, auch als Pseudogene bezeichneten Sequenzen auf etwa 1000 bis 3000 Kopien pro haploidem Genom geschätzt.

Als Pseudogene bezeichnet man "defekte" Kopien eines Gens, die in ihrer Sequenz so verändert sind, daß sie entweder nicht mehr transkribiert werden oder ihre Transkripte keine physiologische Bedeutung besitzen.

Die K-Pseudogene sind dadurch gekennzeichnet, daß etwa 90% von ihnen um etwa 70-90 bp am 3'-Terminus verkürzt sind und über eine Reihe interner Mutationen verfügen (44). Der Rest ist entweder am 5'-Terminus verkürzt oder gar nicht. Auch diese Pseudogene zeigen eine Vielzahl interner Mutationen.

Bis auf ein in dieser Arbeit vorgestelltes Pseudogen teilen alle diese Pseudogene strukturelle Ähnlichkeiten mit den folgenden Klassen an repetitiven Elementen, sodaß sie wahrscheinlich alle über den gleichen Mechanismus im Genom verteilt wurden. Diese repetitiven Elemente sind die prozessierten Pseudogene, zu denen möglicherweise auch die Sequenzen der Alu-Familie gehören (67), die 7S L- und die snRNA-Pseudogene sowie die sekundären Pseudogene (68-71).

Für die Entstehung dieser Pseudogene wird heute angenommen, daß sie durch die reverse Transkription der jeweiligen RNA und die anschließende Integration der synthetisierten cDNA-Kopien in das Genom gebildet werden, wobei der Integrationsmechanismus zur Entstehung sog. "direct repeats" führt, die ein Kennzeichen der mobilen, genetischen Elemente darstellen. Daher bezeichnet man Pseudogene auch als Retrotransposons (72).

Ziel dieser Arbeit war es, aus der Vielzahl der zur menschlichen K-RNA homologen Sequenzen, diejenige zu isolieren, die das Gen repräsentiert. Nach der anschließenden Charakterisierung dieses 7S K RNA Gens hinsichtlich seiner genomischen Organisation sollte durch in vitro Transkription mit RNA-Polymerase III-haltigen Zell-Extrakten geklärt werden, ob in diesem Gen die gleichen regulatorischen Sequenzen zur Transkription benützt werden wie in den bisher bekannten RNA-Polymerase III-Genen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Herkunft der verwendeten Enzyme und Chemikalien

Aminosäuren	Serva (Heidelberg)
Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agar-Agar	Serva (Heidelberg)
Agarose	BRL (Neu-Isenburg)
Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1.)	Boehringer (Mannheim)
α -Amanitin	Boehringer (Mannheim)
Amberlite	Serva (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Boehringer (Mannheim)
Bacto-Agar	Difco (Detroit)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit)
Bis	Serva (Heidelberg)
BSA	Boehringer (Mannheim)
Casaminosäuren	Difco (Detroit)
Desoxyribonukleotide	Serva (Heidelberg)
Didesoxyribonukleotide	Serva (Heidelberg)
Diaminopimelinsäure	Sigma (München)
T ₄ -DNA-Ligase (E.C. 6.5.1.1.)	Boehringer (Mannheim)
DNA-Polymerase I (E.C. 2.7.7.7.)	Boehringer (Mannheim)
DNA-Polymerase I, Klenow- Enzym (E.C. 2.7.7.7.)	Boehringer (Mannheim)
DNase I, Reinheitsgrad I (E.C. 3.1.21.1)	Boehringer (Mannheim)
DTT	Serva (Heidelberg)
E.Coli DNA-Ligase	PL-Pharmacia (Freiburg)
Ethidiumbromid	Boehringer (Mannheim)
Ficoll 400	PL-Pharmacia (Freiburg)
Hefeextrakt	Difco (Detroit)
HEPES	Serva (Heidelberg)
8-Hydroxychinolin	Serva (Heidelberg)
IPTG	Sigma (München)
MEM (n. Joklik)	Gibco, Karlsruhe
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schüll (Dassel)
NP 40	BDH (Poole)
Nylonmembranen	Pall (Dreieich)
	Amersham Buchler (Braunschweig)
PEG 6000	Sigma (München)

γ -P-Orthophosphat (285 Ci/mg P) Penicillin G T ₄ -Polynukleotidkinase Polyvinylpyrrolidon Proteinase K (E.C. 3.4.21.14.) Restriktionsenzyme	Amersham Buchler (Braunschweig) Serva (Heidelberg) PL-Pharmacia (Freiburg) Sigma (München) Merck (Darmstadt) BRL (Neu-Isenburg) Boehringer (Mannheim) PL-Pharmacia (Freiburg) Stehlin (Basel) Stehlin (Basel)
RNA-abhängige DNA-Polymerase aus Avian Myoblastosis Virus RNA-Adenyltransferase T ₄ -RNA-Ligase Ribonuklease H (E.C.3.1.26.4.) Ribonuklease T ₁ ("Fingerprint grade") Ribonukleotide Serum von neugeborenen Kälbern Soja-Pepton Streptomycinsulfat TEMED Terminale Desoxynukleoti- dyl Transferase tRNA (α - γ -P)-ATP (600 Ci/mmol) (α - γ -P)-UTP (600 Ci/mmol) Vitamine Xgal	PL-Pharmacia (Freiburg) PL-Pharmacia (Freiburg) BRL (Neu-Isenburg) Calbiochem (Giessen) bzw. Sankyo (Tokyo) Sigma (München) Flow (Meckenheim) Oxoid (England) Serva (Heidelberg) Bio-Rad Laboratories, Richmond PL-Pharmacia (Freiburg) Boehringer (Mannheim) NEN (Neu-Isenburg) NEN (Neu-Isenburg) Serva (Heidelberg) Sigma (München)

Alle übrigen Chemikalien wurden p.a. von den Firmen Baker, Fluka, Merck oder Serva bezogen.

2.2. Isolierung von radioaktiv markierter und radioaktiv nicht markierter RNA aus Zellkulturzellen

2.2.1. Zellkultur und verwendete Zelllinie

Zur Präparation von Nukleinsäuren und Extrakten aus menschlichem Zellmaterial wurde die Zelllinie HeLa S₃ verwendet. Diese Zellen entstammen einem Zervixkarzinom, weisen einen aneuploiden Chromosomensatz auf und gehören morphologisch dem Epithelgewebe an. Der Subklon S₃ wurde 1955 von T. T. Puck et al. (73) isoliert und zeichnet sich durch eine besonders hohe Widerstandsfähigkeit bei der Haltung in einer Suspensionskultur aus. Die Zellen wuchsen entweder in Gewebekulturschalen als Zellrasen in einem von R. Dulbecco modifizierten Medium nach H. Eagle (74), dem 10% fetales Kälberserum zugesetzt war, oder aber als Suspensionskultur in Jokliks MEM-Medium mit 5% Serum aus neugeborenen Kälbern bei 37 °C. Die Zelldichte in der Suspensionskultur lag zwischen 5×10^5 und 8×10^5 Zellen/ml Medium.

2.2.2. Isolierung von radioaktiv markierter und radioaktiv nicht markierter RNA

Die Isolierung von RNA ließ sich nach einer modifizierten Vorschrift von Lenk et al. (75) durchführen.

Dazu konnten die Zellen bei Raumtemperatur abzentrifugiert (GSA-Rotor, 1000 rpm, 5 Minuten; $170 \times g$) werden, während alle weiteren Schritte bei 4 °C erfolgten.

Die erhaltenen Zellsedimente waren dann in 1/50 Volumen kaltem Earles-Puffer (76) zu resuspendieren und erneut abzentrifugieren (Minifuge GL, 1000 rpm, 5 Minuten; $185 \times g$). Nach Aufnehmen der Zellen in 15 ml hypotonem Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6.0 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂) pro 10^8 Zellen wurde die Suspension zum Anschwellen der Zellen 30 Sekunden auf Eis belassen, dann mit 10%igem NP 40 auf eine Endkonzentration von 0.25 % gebracht, 45 Sekunden vorsichtig im Eisbad geschüttelt und die erfolgte Zellyse unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Zur Abtrennung des löslichen Zytoplasmas folgte eine Zentrifugation (Minifuge GL, 1600 rpm, 5 Minuten; $440 \times g$). Der anfallende, zytoplasmatische Überstand wurde aufbewahrt und das Sediment dann in 7.5 ml Lysispuffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Das Zytoskelett ließ sich danach in einem 15 ml Dounce-Homogenisator durch 15-20 Stöße mit einem B-Pistill von den Zellkernen abtrennen. Dies ließ sich ebenfalls unter dem Phasenkontrastmi-

kroskop überprüfen. Die Abtrennung der Zellkerne erfolgte durch eine erneute Zentrifugation in der Minifuge (2000 rpm, 5 Minuten; 750 x g).

Anschließend wurden die Polysomen der beiden zytoplasmatischen Überstände durch eine Ultrazentrifugation (SW 60Ti-Rotor, 60 Minuten, 50000 rpm; 337000 x g) sedimentiert und damit ein Großteil der ribosomalen RNA abgetrennt.

Der partikelfreie Überstand wurde auf 0.5 % SDS, 0.3 m NaAc und 1 mM EDTA gebracht, zum proteolytischen Abbau der Proteine mit 250 ug/ml Proteinase K versetzt, 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und nach der Methode von Palmiter (77, 78) phenolextrahiert (Phenol-Lösung: 500 ml destilliertes Phenol, 70 ml destilliertes m-Kresol, 225 ml Aqua bidest., 0.5 g 8-Hydroxychinolin; Chloroform-Lösung: 99 % Chloroform p.A., 1 % Isoamyl-alkohol).

2.2.3. Auftrennung von RNA durch Polyacrylamidgelelektrophorese

Sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von niedermolekularen RNA-Spezies konnten nur Polyacrylamidgele verwendet werden, da nur diese Gelsysteme eine genügend hohe Trennkapazität aufweisen. Die verwendeten Gelsysteme waren:

a) SDS-Polyacrylamidgradientengele (SDS-Paa.grad.gele)

Mit Hilfe einer Gradientenmischkammer wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1.3 mm ein lineares, 6-15%-iges Gradientengel mit einem Gelvolumen von 26 ml gegossen. Über das polymerisierte Trenngel wurde ein 2.5%iges Sammelgel gegossen, in dem mit Hilfe eines Plexiglaskamms mehrere Taschen zur Probenaufnahme ausgepaart wurden. Zur Elektrophorese wurde die Probe mit einem Volumen 2xRNA-Probenpuffer versetzt und in die jeweilige Tasche aufgetragen. Nach Auftragen der Probe erfolgte die Elektrophorese für 750 VxStunden. Der Nachweis der RNA erfolgte nach beendeter Elektrophorese entweder durch Autoradiographie oder durch Anfärben der RNA mit Ethidiumbromid, indem das Gel in einer Färbelösung (0.5 ug Ethidiumbromid pro ml H_2O) 20 Minuten geschüttelt wurde. Die verwendeten Lösungen waren:

RNA-Elektrophoresepuffer: 2.88% Glyzin; 0.72% Tris-Base;
0.1% SDS

2xRNA-Probenpuffer : 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS;
10% Glycerin; 0.2% Bromphenolblau

Gellösungen:	6%	15%	2.5%
H ₂ O	9.5 ml	4.1 ml	7.8 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.9 ml	1.9 ml	1.2 ml*
50% Glyzerin	0.3 ml	1.25 ml	-
10% SDS	0.15 ml	0.15 ml	0.1 ml
30% Acrylamid/ 0.8%	3.0 ml	7.5 ml	0.8 ml
<u>Bisacrylamid</u>			
5% TEMED	81 µl	81 µl	50 µl
10% Ammoniumper- sulfat	50 µl	50 µl	250 µl

* 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

b) Harnstoff-Polyacrylamidgele (U-Page)

Zur Elektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen wurden 6%ige Polyacrylamidgele in Gegenwart von 8 M Harnstoff benützt. Auch hier wurde die Gel-Lösung zwischen 2 Glasplatten mit einem Abstand von 1.3 mm gegossen, wobei mittels eines Plexiglaskamms mehrere Taschen zur Probenaufnahme ausgespart wurden. Die Proben wurden in einem Volumen RNA-Ld-Puffer aufgenommen, 2 Minuten bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA für 3.5 Stunden. Der Nachweis der radioaktiv markierten RNA erfolgte durch Autoradiographie des getrockneten Geles. Die verwendeten Lösungen waren:

Elektrophoresepuffer	: 89 mM Tris-Borat; 89 mM Borsäure;
(1xTEB)	2 mM EDTA
RNA-Ld-Puffer	: 50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM EDTA, 89% Formamid; 0.1% Xylen Cyanol FF; 0.1% Bromphenolblau
Gel-Lösung	: 24 g Harnstoff; 10 ml 30% Acrylamid/
(pro 50 ml)	0.8% Bisacrylamid; 5 ml 10xTEB
	(Starten des Polymerisationsvorganges durch Zugabe von 150 µl 10%igem Ammoniumpersulfat und 75 µl konz. TEMED)

2.2.4. Elution diskreter RNA-Spezies aus SDS-Polyacrylamidgelen

Die Elution diskreter RNA-Spezies erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Maxam-Gilbert (79). Hierzu wurde die jeweilige RNA-Bande mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten, in kleine Würfel zerkleinert, mit 5 Volumen Elutionspuffer (0.3 M

Na-Azetat, 1 mM EDTA, 0.2% SDS, 100 µg/ ml Proteinase K, pH 7.0) versetzt und mindestens 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend ließen sich die Gelbröckchen über silanisierte Glaswolle abfiltrieren; das Eluat wurde dann phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.) und die RNA mit 3 Volumen Ethanol in Gegenwart von 100 µg/ml Glycogen ausgefällt. Nach einer zweiten Ethanol-fällung ließ sich die getrocknete RNA in sterilem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1 mM EDTA) resuspendieren und bei -20 °C lagern.

2.2.5. Autoradiographie

Um radioaktiv markierte Moleküle in einem Gel nachzuweisen, wurde auf das getrocknete Gel ein Röntgenfilm (Fuji RX) aufgelegt und der Film in einer Kassette bei -70 °C mit einer Cronex-Verstärkerfolie (Du Pont) belichtet. Die Entwicklung des Filmes erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Die Autoradiographie nicht getrockneter Gele erfolgte ohne Verstärkerfolie bei Raumtemperatur.

Alle Röntgenfilme wurden routinemäßig mit Hilfe eines Elektronenblitzes auf eine $OD_{250} = 0.1$ vorbelichtet (80). Entsprechend konnten auch die radioaktiven Signale auf Nylonmembranfiltern autoradiographiert werden.

2.3. Radioaktive Markierung von RNA mit ^{32}P -haltigen Verbindungen

2.3.1. In vivo Markierung von RNA mit ^{32}P -Orthophosphat

Für möglichst hohe Einbauraten bei der in vivo Markierung von RNA mit ^{32}P -Orthophosphat mußte ein phosphatarmes Kulturmedium verwendet werden. Dieses unterschied sich von Jokliks MEM-Medium (81) dadurch, daß es an Stelle der Phosphatsalze 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.2, enthielt. Diesem Medium wurden vor der in vivo Markierung pro Liter 5.1 mg NaH_2PO_4 zugesetzt, sodaß sich unter Berücksichtigung des im Serum enthaltenen Phosphates (82) eine Endkonzentration von 6 mg NaH_2PO_4 / l Medium ergab, im Gegensatz zu der Konzentration von 850 mg Phosphat/l im Normalmedium. Für die RNA-Markierung wurden 300 ml HeLa S₃ Zellen (Index 60-80) steril abzentrifugiert (GSA-Rotor, 1000 rpm, 5 Minuten, Raumtemperatur; 170 x g), in 150 ml phosphatarmen Medium aufgenommen und nach Zugabe von 10 mCi ^{32}P -Orthophosphat über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ende der Markierung konnte die RNA, wie unter 2.2.2. beschrieben, isoliert werden.

2.3.2. In vitro Markierung von RNA mit 3'-(5'- α - 32 P) Cytidindiphosphat

Die radioaktive Markierung diskreter RNA-Spezies konnte auch entsprechend einer Vorschrift von Uhlenbeck et al. (83) erfolgen, bei der am 3'-Ende der RNA mit T₄-RNA-Ligase 3'-(5'- α - 32 P) Cytidindiphosphat angefügt wird.

Hierzu wurde aus 3'-Cytidinmonophosphat, T₄-Polynukleotidkinase und (α - 32 P)-ATP das 3'-(5'- α - 32 P)-Cytidindiphosphat synthetisiert. Für diese Reaktion wurden 150 μ Ci lyophilisiertes (α - 32 P)-ATP (50 pmol) und 200 pmol Cytidinmonophosphat mit 250 U/ml T₄-Polynukleotidkinase in 4 μ l Synthesepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 9.5; 12.5 mM MgCl₂, 20 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM Spermin) 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, 1 Minute auf 95°C zum Denaturieren der Proteine erhitzt, mit T₄-RNA-Ligasepuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l gebracht und phenolisiert (2.2.2.). Ein Aliquot von 0.1 μ l wurde zur Analyse auf eine PEI-Zellulose-Platte aufgebracht und in 0.8 M (NH₄)₂SO₄ in aufsteigender Richtung chromatographiert (84).

In der anschließenden Autoradiographie der Dünnschichtplatte ließ sich die Reaktionsausbeute durch Vergleich der Signalposition und der Signalintensität mit der des ebenfalls aufgetragenen (α - 32 P)-ATP bestimmen. Der restliche Ansatz wurde erneut lyophilisiert und in 10 μ l H₂O gelöst.

Zur Markierung der RNA wurde die RNA in 5 μ l 6xkonzentriertem RNA-Ligasepuffer (1xkonzentriert: 50 mM HEPES, pH 8.2; 12 mM MgCl₂, 5 mM DTT) zu dem gelösten Lyophilisat gegeben und diese Mischung auf eine Endkonzentration von 14% DMSO sowie 15% Glycerin in einem Gesamtvolumen von 30 μ l gebracht. Die Reaktion erfolgte mit 225 U/ml T₄-RNA-Ligase für 20 Stunden bei 4 °C. Die Abtrennung des nicht an die RNA ligierten Cytidindiphosphates erfolgte durch Ausfällen der RNA durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol in Gegenwart von 2.5 M NH₄Ac und 300 μ g/ml Glykogen für 15 Minuten bei -70 °C.

Die durch Zentrifugation (9000 x g, 15 Minuten, Raumtemperatur) sedimentierte RNA ließ sich dann in TE, pH 7.5, lösen und bei -20 °C aufbewahren.

2.4. Isolierung von Plasmid-DNA

2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen basierte auf einem von Birnboim et al. (85) entwickelten Verfahren, das

nach dem Protokoll von Maniatis et al. (86) modifiziert wurde. Dabei konnten bis zu 4.5 ml der Übernachtskultur aufgearbeitet werden, wenn die angegebenen Aufschlußvolumina verdoppelt wurden. Zur Abtrennung eines Großteils der hochmolekularen RNA wurde die wässrige Phase vor der Phenolextraktion auf 2.5 M NH_4Ac gebracht, diese Mischung 5 Minuten auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (9000 x , 5 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand dann, wie bei Maniatis et al. (s.o.) beschrieben, aufgearbeitet.

2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen verlief im wesentlichen ebenfalls nach einer von Maniatis et al. (87) beschriebenen Methode:

Allerdings wurden die Aufschlußvolumina verdoppelt, die Lysozymzugabe erfolgte erst nachdem die Bakterienzellen in Lösung I (87) resuspendiert waren und die RNA ließ sich nach einem veränderten Verfahren abtrennen, d.h., die Behandlung mit RNase A und die anschließende Säulenchromatographie wurde durch folgendes Verfahren ersetzt:

Das mit Isopropanol ausgefällte RNA-Plasmidgemisch in 8 ml TE-Puffer gelöst, mit festem NH_4Ac auf eine Endkonzentration von 2.5 M gebracht und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (16000 x g, 10 Minuten, 4 °C; HB 4 Rotor) konnte die Plasmid-DNA durch die Fällung mit Ethanol isoliert werden. Nach einer zweiten Fällung mit Ethanol erfolgte die CsCl -Gleichgewichtszentrifugationen zur Abtrennung der RNA zweimal und in einem Vertikalrotor (TV 865-Rotor, 240000x g, 22 °C, 50000 rpm, 5 Stunden).

2.5. Radioaktive Markierung von DNA mit ^{32}P -haltigen Verbindungen

2.5.1. In vitro Markierung von DNA mit $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$

Die radioaktive Markierung von DNA mit $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$ (spez. Akt.: > 3000 Ci/mmol) und T_4 -Polynukleotidkinase folgte dem, von Maniatis et al. (88) beschriebenen Verfahren, wobei aber die Reaktionszeit für die Kinasierung auf mindestens 3 Stunden erhöht wurde.

Dabei verlief die Dephosphorylierung der eingesetzten DNA-Fragmente wie in Abschnitt 2.12.2 beschrieben.

2.5.2. In vitro Markierung von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E.Coli

Die radioaktive Markierung von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I erfolgte mit kleinen Abweichungen nach dem von Maniatis et al. (89) beschriebenen Verfahren.

So wurden für die Reaktion zwischen 0.2-1.0 U des Enzyms pro µg DNA eingesetzt, der verwendete Puffer enthielt: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 20 µCi (25 pmol) des radioaktiv markierten dNTP's sowie 100 µM nicht radioaktiv markierte dNTPs.

Die Abtrennung des größten Teils der nicht inkorporierten dNTPs konnte gegebenenfalls durch Säulenchromatographie mit Sephadex G 50 (Säulendimension: 5 ml Einmalpipette) oder durch Ausfällen der DNA mit Ethanol in Gegenwart von 2.5 M NH₄Ac erfolgen.

2.5.3. In vitro Markierung von DNA mit DNA-Polymerase I aus E.Coli, "Nicktranslation"

Ein weiteres Verfahren zur radioaktiven Markierung von DNA bestand in der, ebenfalls bei Maniatis et al. (90, 91) beschriebenen, sog. "Nicktranslation".

Dazu wurden 100 ng Plasmid- oder M13 RF-DNA, wie bei Maniatis et al. (90, 91) beschrieben, mit 25 µCi (α-³²P)-dATP oder -dCTP (spez. Akt.: 800 Ci/mmol) oder aber mit beiden dNTPs markiert. Die "nicktranslatierte" DNA wurde durch Chromatographie mit einer Sephadex G 50 Säule (Säulenvolumen: 5 ml) von dem größten Teil der nicht inkorporierten dNTPs getrennt. Die spezifische Aktivität der markierten Proben lag zwischen 1x und 5x10⁶cpm pro µg eingesetzter DNA.

2.6. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek

2.6.1. In vitro Polyadenylierung diskreter RNA-Spezies

Die Polyadenylierung von 7S K RNA erfolgte mit ATP und RNA-Adenyltransferase (Poly-(A)-Polymerase) nach einem Verfahren von A. E. Sippel (92). Dazu wurde unter Berücksichtigung der in Abschnitt 3.2.1. aufgeführten Faktoren die Polyadenylierungsreaktion wie folgt durchgeführt:

Zu 1 µg 7S K RNA (10 pmol) wurden 11 µl steriles H₂O, 1 µl dest., 4 µl 5xkonz. PAP-Puffer, 2 µl 1 mM ATP, 2 µl BSA-Lösung (100 µg/ml) und 1 µl Enzym-Verdünnung (0.9 U) gegeben. Für radioaktive Markierung der RNA während der Polyadenylierung

rungsreaktion wurden dem Ansatz 40 μCi (α - ^{32}P)-ATP (spez. Akt.: 800 Ci/mmol) und entsprechend weniger H_2O zugesetzt. Die Reaktion erfolgte dann für 4 Minuten bei 20 °C, wurde dann mit 80 μl 50 mM EDTA, pH 7, gestoppt und wurde 3x, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, phenolisiert. Die polyadenylierte RNA konnte dann mit 3 Volumen Ethanol in Gegenwart von 0.5 mg/ml Glykogen aus der wässrigen Phase ausgefällt werden. Zur weiteren Aufreinigung wurde die RNA noch 2x aus 0.4 M LiCl mit Ethanol umgefällt. Die so polyadenylierte RNA ließ sich in H_2O bei -20 ° aufbewahren. Die verschiedenen Puffer hatten folgende Zusammensetzung:

5x konz. PAP-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM MgCl_2
250 mM NaCl, 2.5 mM MnCl_2

Enzym-Verdünnungs- : 25 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl, 50%
puffer (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA

2.6.2. Synthese des ersten Stranges

Die reverse Transkription einer in vitro polyadenylierten RNA erfolgte im wesentlichen genauso wie die der aus Zellextrakten isolierten poly (A⁺)-RNA. Sie verlief in zwei Teilschritten im pH-Optimum der Reversen Transkriptase gemäß folgendem Protokoll:

- Für die Hybridisierung des Oligo-(dT)-Primers an die in vitro polyadenylierte 7S K RNA wurden zu je 100 ng, in 1 μl H_2O gelöster oligo (A⁺)-RNA, 2.5 μg Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer (3 μl), 1 μl 1.25 M Tris-HCl, pH 8.3, 1 μl 1.25 M KCl und je dNTP 2.5 μl einer 10 mM Stamm-Lösung gegeben. Das Hybridisieren des Primers an die RNA erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
- Die Synthese des ersten Stranges der cDNA wurde durch Zugabe von 1 μl 0.25 M MgCl_2 , 1 μl 0.25 M DTT, 6 μl H_2O und 1 μl Reverser Transkriptase aus Avian Myoblastosis Virus (23.8 U/ μl) gestartet. Die Reaktion verlief dann bei 42 °C für 2 Stunden.

Zur Bestimmung der Menge an synthetisierter cDNA wurde in einem Parallelansatz das zugesetzte H_2O durch ein gleiches Volumen (60 μCi) radioaktiv markiertes dNTP (spez. Akt.: 800 Ci/mmol) ersetzt.

Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 25 μl 50 mM EDTA, pH 7, beendet (Endkonzentration 25 mM EDTA).

Während die Syntheserate durch Ausfällen der radioaktiv markierten cDNA mit 10% TCA und anschließende Szintillationsmessung bestimmt wurde, ließ sich die Länge des in Gegenwart von radioaktiv markierten dNTPs gebildeten Transkriptes auf 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (s. 2.2.3., aber 40% Acrylamid/ 2% Bisacrylamid) analysieren.

Zum Erstellen der cDNA-Bibliothek erfolgten mehrere Ansätze, die nach Beendigung der Reaktion vereinigt und, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, phenolisiert wurden. Die cDNA wurde aus der wässrigen Phase in Gegenwart von 20 µg/ml Glykogen und 2.5 M NH₄Ac mit Ethanol ausgefällt.

Die Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase waren demgemäß:

50 mM Tris-HCl, pH 8.3	10 mM DTT
50 mM KCl	je 1 mM dNTP
10 mM MgCl ₂	
4 µg/ml oligo(A) _n K-RNA (= 40 µg/ml K-RNA)	
25 µg oligo (dT) ₁₂₋₁₈ /µg oligo(A) _n K-RNA	
und 238 U Reverse Transkriptase/µg oligo(A) _n K-RNA	

2.6.2. Synthese des zweiten Stranges

Zur Synthese des zweiten Stranges wurde das Reaktionsprodukt aus der reversen Transkription noch zweimal aus 0.4 M LiCl mit Ethanol umgefällt und das getrocknete DNA-RNA Hybrid in H₂O zu einer Konzentration von 10 ng/µl gelöst. Anschließend erfolgte die Reaktion zur Bildung des 2. Stranges wie bei Gubler und Hoffman (93) sowie bei Okayama und Berg (94) beschrieben. Dabei waren in einem Reaktionsansatz von 100 µl Gesamtvolumen enthalten:

100 ng 7S K RNA/cDNA Hybrid	1 µg/ml
2 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.5	20 mM
2 µl 0.25 M MgCl ₂	5 mM
10 µl 0.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
1.5 µl 10 mM β-NAD	0.15 mM
4 µl 1 mM dNTPs	0.04 mM
1 µl BSA (5 mg/ml)	0.05 mg/ml
2 µl RNase H (0.425 U/µl)	8.5 U/ml
5 µl E.Coli DNA-Polymerase I (5U/µl)	250 U/ml
1 µl E.Coli DNA-Ligase (2U/µl)	20 U/ml

Zur Bestimmung der Syntheserate und der Länge der gebildeten

cDNA wurden darüber hinaus 5 μ l (50 μ Ci) eines radioaktiv markierten dNTPs (spez. Akt.: 800 Ci/mmol) zugesetzt. Das Volumen wurde mit sterilem $H_2O_{bidest.}$ auf 100 μ l gebracht. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 12 °C und eine weitere Stunde bei 22 °C. Die Reaktion ließ sich dann durch Zugabe von EDTA, pH 7, auf eine Endkonzentration von 20 mM beenden. Die Proben wurden dann wie nach der Synthese des ersten Stranges behandelt.

Sowohl RNase H als auch die E.Coli DNA-Ligase wurden aus den Stammlösungen auf die jeweils gewünschte Konzentration verdünnt. Die dazu benötigten Puffer waren:

RNase H-Verdünnungs- : 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$,
 puffer : 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT,
 50 μ g/ml BSA, 50 % (v/v) Glycerin

E.Coli DNA-Ligase- : 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl,
 Verdünnungspuffer : 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mM EDTA, 1 mM
 DTT, 0.2 mg/ml BSA, 50 % (v/v) Glycerin.

2.6.4. Synthese homopolymerer Enden an Vektor- und cDNA (95)

Zur Synthese homopolymerer Enden wurden die DNA des Plasmid-Vektors pAT 153 (96) mit dem Restriktionsenzym Sph I linearisiert.

Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch Transformation (s. Abschnitt 2.12.4.) kompetenter C 600 Bakterien (s. Abschnitt 2. 12.3.) mit einem 100 ng Aliquot des linearisierten Vektors überprüft. Die restliche Probe wurde phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2), mit Ethanol gefällt und in TE, pH 8, mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei -70 °C aufbewahrt.

Die Synthese homopolymerer Enden verlief dann bei 30 °C für 45 Minuten in einem Gesamtvolumen von 20 μ l gemäß:

3 μ l mit Sph I linearisierte Vektor-DNA (3 μ g, 2.5 pmol)
 4 μ l 5x konz. TdT-Puffer
 2 μ l 25 μ M dCTP (50 pmol)
 10 μ l $H_2O_{bidest.}$
 1 μ l Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (11 U)

Zur Bestimmung der Syntheserate und der Länge der gebildeten Homopolymere wurde das nicht markierte dCTP durch die entsprechende Menge radioaktiv markiertes (α - ^{32}P)-dCTP ersetzt.

Die Syntheserate und die Länge der synthetisierten Homopolymere wurde, wie in Abschnitt 2.6.1. beschrieben, bestimmt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Minuten beendet und die Probe auf einem 0.8%igen Agarosegel zur Abtrennung von restlichen Spuren nicht linearisierter Vektor-DNA 4 Stunden bei 80 V in 1x TEB (s. Abschnitt 2.12.1.) elektrophoriert. Die linearisierte Plasmid-DNA ließ sich unter Verwendung einer NA-45-Membran (s. Abschnitt 2.11.2.) eluieren. Die Konzentration der eluierten DNA wurde auf 50 ng/µl eingestellt.

Zur Verknüpfung von Vektor- und ds-cDNA durch Wasserstoffbrückenbindung wurden an die ds-cDNA (dG)-Homopolymere addiert. Dazu wurde die ds-cDNA zweimal aus 0.4 M LiCl mit Ethanol in Gegenwart von 20 µg/ml Glykogen umgefällt und mit H₂O₁₀₀ dest. auf eine Konzentration von 2.3 µg/ml gebracht und zur Addition der Homopolymere eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 1 Stunde bei 30 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemäß:

- 13 µl ds-cDNA (30 ng bzw. 0.3 pmol)
- 4 µl 5x konz. TdT-Puffer
- 2 µl 10 mM dGTP
- 1 µl Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (11 U)

Die Synthese wurde durch Denaturieren des Enzyms bei 70 °C für 10 Minuten beendet, der Ansatz dann phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.) und die ds-cDNA aus 0.3 M NaAc, pH 5.5, mit Ethanol ausgefällt. Nach Einstellen einer DNA-Konzentration von etwa 2 ng/µl konnte diese Lösung bei -20 °C gelagert werden.

5x konz. TdT-Puffer : 0.5 M K-Cacodylat, pH 6.9, 5 mM CoCl₂,
1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA

2.6.5. Klonierung der cDNA

Die Verknüpfung der ds-cDNA mit dem Plasmid-Vektor wurde nach einem von Peacock et al. (97) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Die Hybridisierung von 400 ng Vektor-DNA (pAT 153, mit (dG)-Homopolymeren) an 8 ng ds-cDNA (mit (dC)-Homopolymeren) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemäß:

- 8 µl Vektor-DNA (400 ng)
- 4 µl ds-cDNA (8 ng)
- 5 µl 10x konz. Hybridisierungspuffer (10x konz: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1.5 M NaCl)

33 µl H₂O

Die Proben wurden dazu 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, 2 Stunden bei 58 °C hybridisiert und über Nacht langsam mit 1 °C/ Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt und der gesamte Ansatz bei -20 °C eingefroren.

2.7. Isolierung spezifischer cDNA-Klone aus einer in Plasmide klonierten cDNA-Bibliothek

2.7.1. Herstellung von "Master- und Replika-Filtern"

Die Herstellung von Replika-Filtern entsprach im wesentlichen dem von Hanahan et al. (98) beschriebenen Verfahren, wobei allerdings die dort verwendeten Nitrozellulosefilter durch Nylonmembranen ersetzt wurden.

Zum Ausplattieren der cDNA-Bibliothek wurden 8 Transformationsansätze (s. Abschnitt 2.12.3.) kurz abzentrifugiert (9000x g, 20 Sekunden, Hettich-Tischzentrifuge, Raumtemperatur), die Sedimente in 150 µl altem Medium vorsichtig resuspendiert und die Bakterienlösungen anschließend vereinigt.

Nylonmembranfilter (Ø 132 mm, Porengröße 0.2 µm) wurden zum Herauswaschen von Detergenzresten aus den Membranen 10 Minuten in H₂O_{100°C} gekocht, zwischen Filterpapier gelegt, in Alufolie eingeschlagen, autoklaviert und steril aufbewahrt.

Vor dem Ausplattieren des prozessierten Transformationsansatzes wurden die Filter luftblasenfrei auf LB-Platten (s. Abschnitt 2.12.4) mit 100 µg Ampicillin/ml Medium gelegt und die Bakterienlösung mit einem sterilen Glasstab gleichmäßig über die Nylonmembranen verteilt. Diese "Matrizen-Filter" wurden bei 37 °C solange inkubiert, bis die auftretenden Bakterienkolonien gerade erkennbar waren.

Von jedem dieser Matrizenfilter ließen sich je 4 Replikas (2 Hybridisierungs- und 2 Einfrier- bzw. "Master-" Filter abziehen. Zunächst wurden die Replikafilter zum Anfeuchten entweder auf Einfrierplatten oder auf Ampicillinplatten gelegt. Der Matrizenfilter wurde dann mit den Bakterienkolonien nach oben auf steriles Filterpapier gelegt und der angefeuchtete Replikafilter mit der Seite aufgebracht, die nicht den Agar berührt hatte. Dieser Aufbau wurde mit sterilem Filterpapier bedeckt und kräftig mit einer Glasplatte zusammengepreßt. Nach der Markierung der Filterpositionen mit einer glühenden Injektionsnadel wurden die Filter langsam auseinandergezogen und mit der Bakterienseite nach oben auf ihre ursprünglichen Platten gelegt. Die Hybridisierungsfilter wurden weitere 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser

von etwa 0.5 mm aufwiesen. Danach erfolgte der Transfer dieser Filter auf Platten, die 10 µg/ml Chloramphenicol enthielten, um die Plasmide zu amplifizieren.

Die Einfrier- bzw. "Master"-Filter wurden wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben weiterbehandelt.

Die Platten mit den Matrizenfiltern dagegen wurden mit Parafilm abgedichtet und bis zum Abschluß der Hybridisierungsexperimente im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7.2. Aufbereitung der Replika-Filter zur Hybridisierung

Zur Hybridisierung mußten zunächst die Bakterien lysiert werden. Dazu wurden die Filter mit den Bakterienkolonien nach oben auf mehrere Lagen Filterpapier gelegt, das mit 0.5 N NaOH getränkt war und 10 Minuten bei Raumtemperatur darauf belassen. Die Neutralisierung erfolgte durch zweimalige Inkubation für 5 Minuten auf mit 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, getränktem Filterpapier. Hieran schloß sich eine weitere Inkubation auf 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4/ 1.5 M NaCl an, um die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Membran zu binden. Die Filter konnten dann an der Luft getrocknet werden.

Zur Entfernung bakterieller Proteine wurden die Filter kurz so durch eine Lösung von 1 mg Proteinase K/ml 1x SSC gezogen, daß die Seite mit der DNA nicht benetzt wurde. Die Proteolyse erfolgte dann für 45 Minuten auf einer Lage Filterpapier, daß mit 1x SSC getränkt war. Anschließend wurde die DNA durch Backen bei 80 ° für 1 Stunde an der Filtermembran immobilisiert.

Nachdem die DNA so fixiert worden war, konnte die vollständige Entfernung der bakteriellen Proteine erfolgen. Dazu wurden die Filter über Nacht in 50 ml 1x SSC mit 0.1 mg Proteinase K/ml geschüttelt, so daß sie nach Waschen in 1x SSC vorhybridisiert werden konnten.

1x SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat, pH 7.5

2.7.3 Kolonienhybridisierung

Die aufbereiteten Bakterienfilter wurden anschließend in 4 ml Vorhybridisierungspuffer pro 100 cm² Membranfläche mindestens 6 Stunden bei 50 °C vorhybridisiert, sofern nicht anders vermerkt, um die unspezifische Bindung der radioaktiv markierten Probe an die Membran zu minimieren.

Die Filter wurden dann mit 2 ml Hybridisierungspuffer/ 100 cm² Membranfläche und der radioaktiv markierten Probe in neue Plastik-

tüten eingeschweißt und 36 Stunden unter oben genannten Bedingungen hybridisiert. Die unspezifisch an die Filter gebundene Radioaktivität wurde anschließend durch Waschen der Filter entfernt. Dazu wurden die Filter zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1x SSC/0.1x SDS und dreimal für 45 Minuten bei 50 °C in 0.1x SSC/0.1x SDS geschüttelt, an der Luft getrocknet und autoradiographiert (s. Abschnitt 2.2.5.).

Wurde zur Hybridisierung in vitro radioaktiv markierte RNA (s. Abschnitt 2.3.2.) eingesetzt, so entsprachen Hybridisierungs- und Vorhybridisierungspuffer dem unten angegebenen, wobei der Hybridisierungspuffer zusätzlich die denaturierte, radioaktive Probe enthielt. Für die radioaktiv markierte DNA-Probe wurde der in Abschnitt 2.10.2 beschriebene Hybridisierungspuffer verwendet.

(Vor-) Hybridisi-: 50 % Formamid, 5x SSC , 5x Denhardt's, 0.1%
sierungslösung SDS, 0.25 mg/ml E.Coli-Nukleinsäuren
100x Denhardt's : 2% Ficoll 400000, 2% PVP, 2% BSA (99)

2.7.4. Lagerung der "Master-Filter"

Die Einfrierfilter wurden, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, von den Matrizenfiltern abgezogen, auf die ursprünglichen Einfrierplatten zurückgelegt und 90 Minuten zum Anwachsen der Bakterien bei 37 °C bebrütet, sodaß die Koloniengröße nicht signifikant zunahm. Die Filter wurden dann von den Platten abgenommen, mit einem zweiten sterilen Nylonfilter, der ebenfalls auf einer Einfrierplatte angefeuchtet worden war, bedeckt, dieser Aufbau, wie zuvor, fest zusammengepreßt und ebenfalls markiert. Das entstandene Filter-"Sandwich" ("Master"- und neuer Replika-Filter) wurde zwischen feuchtes, steriles Filterpapier gelegt, in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei -70 °C aufbewahrt.

Einfrierplatten: 500 ml 2x konz. Einfriermedium, 5 g NaCl,
5 g Bactotrypton, 2.5 g Hefeextrakt, 12.5 g
Bacto-Agar, mit H₂O auf 1000ml gebracht,
pH 7.5; autoklavieren und nach Abkühlen auf
45 °C mit 100 mg/l Ampicillin versetzt.
2x konz. Ein- : 12.6 g K₂HPO₄, 3.6 g KH₂PO₄, 0.9 g Na-Citrat
friermedium x 2 H₂O, 0.18 g MgCl x 7 H₂, 100 ml 86% Gly-
cerin, 1.8 g (NH₄)₂SO₄, mit H₂O auf 1000 ml
gebracht.

Zum Auftauen der cDNA-Bank wurde das "Filter-Sandwich" bei Raumtemperatur gehalten, dann der Deckfilter auf eine neue Agarplatten gegeben und 3-5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der

Masterfilter konnte wie oben beschrieben nach der erneuten Inkubation auf Einfrierplatten anschließend bei -70° wiederum gelagert werden.

2.8. Isolierung spezifischer Klone aus einer in Bakteriophagen klonierten Genbibliothek

2.8.1. Handhabung der Genbibliothek

Zur Isolierung 7S K RNA-homologer Sequenzen wurde eine Genbibliothek von T. Maniatis (100, 101) verwendet, die die DNA aus menschlichen, foetalen Leberzellen enthielt. Die genomische DNA dieser Zellen wurde dazu mit dem Restriktionsenzym Eco R I partiell zerlegt und danach auf eine Länge von 15-20 Kbp größenselektioniert. Nach Klonierung dieser DNA-Stücke in die "Eco R I - Site " des speziell dafür konstruierten - Phagenvektor "Charon 4 A" (102) wurde die rekombinante DNA in Phagenpartikel verpackt, die Phagen amplifiziert und in SM-Puffer als Genbank bei 4°C gelagert.

SM-Puffer : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl_2 ,
10 mM CaCl_2 , 0.05% Gelatine

Die Propagation der Phagen erfolgte in den E.Coli K12 Stämmen DP 50 sup F und Q 358. Als Kulturmedium diente SCYDT-Medium, allerdings konnte für den Stamm Q 358 auf die Zusätze Diaminopimelinsäure, Thymidin und Casaminosäuren verzichtet werden.

SCYDT-Medium : 10 g Soja-Pepton, 5 g Hefe (Yeast)-Extrakt,
5 g NaCl, mit H_2O auf 960 ml auffüllen. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 45°C wurden 10 ml 20%ige (w/v) Casaminosäuren, 10 ml 0.4%iges (w/v) Thymidin, 10 ml 1%ige (w/v) Diaminopimelinsäure und 10 ml 1 M MgCl_2 steril zugesetzt.

Agarplatten für den Plaque-Assay wurden mit 1.25% Bacto-Agar für den Boden- und 0.7% Agarose für den Deck-Agar gegossen. Der in der Genbank vorliegende Phagentiter konnte durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe festgestellt werden. Dazu wurden von jeder Verdünnung 100 μl in einem sterilen Schraubverschlußglas mit 100 μl CM-Lösung und 100 μl einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen DP 50 sup F - Kultur ($\text{OD}_{578\text{ nm}} = 1$) versetzt und diese Mischung 10 Minu-

ten bei 37 °C zur Präadsorption der Phagen an die Bakterien inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml einer 45 °C warmen Deck-Agar-Lösung wurde die Suspension kurz durchgemischt und auf eine bei 37 °C vorgewärmte Boden-Agarplatte luftblasenfrei gegeben.

Nach Erstarren des Deck-Agars schloß sich eine Inkubation bei 37 °C für 7-14 Stunden an. Danach ließen sich die durch Lyse der infizierten Bakterien entstandenen Plaques im Bakterienrasen auszählen und so der Phagentiter der Genbank bestimmen.

CM-Lösung : 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$

2.8.2. Herstellung und Aufbereitung von "Phagen-Filtern" zur Hybridisierung

Zum Durchtesten der Genbank auf Phagen, die eine zur 7S K RNA homologe genomische DNA-Sequenz enthielten, wurden die Plaques entweder nach einem von Woo et al. (a: 103, 104) oder nach dem von Benton-Davis (b: 105) beschriebenen Verfahren auf Nylon-Rundfilter übertragen.

a) Die Phagen wurden wie in Abschnitt 2.7.1. beschrieben auf große Boden-Agarplatten (Ø: 145 mm) mit Deckagar ausplattiert und solange bei 37 °C bebrütet, bis die auftretenden Phagenplaques gerade erkennbar wurden. Für derartig kleine Plaquesdurchmesser wurden die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Bakterien dem Präadsorptionsgemisch 10x konzentriert zugesetzt.

Nylonmembranfilter (Ø 132 mm, Porengröße 0.2 µm) wurden zum Herauswaschen von Detergenzresten aus den Membranen 10 Minuten in H_2O ~~bebrütet~~ gekocht, mit Kugelschreiber markiert, zwischen Filterpapier gelegt, in Alufolie eingeschlagen, autoklaviert, unter der Sterilbank bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und steril aufbewahrt.

Zum Abziehen der Filter wurde eine DP 50 sup F Übernachtskultur auf 0.3 OD₂₇₈ verdünnt und solange bei 37 °C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD₂₇₈ von 1 aufwies. Diese Bakteriensuspension wurde in frischem Medium 10x konzentriert und zum Durchfeuchten der sterilen Nylonmembran benutzt. Die mit Bakterien imprägnierten Filter wurden dann 2 Stunden unter der Sterilbank getrocknet. Inzwischen wurden die Phagenplatten mindestens 1 Stunde bei 4 °C zum Aushärten des Deck-Agars aufbewahrt. Anschließend wurden die Filter luftblasenfrei auf die jeweiligen Phagenplatten zentriert aufgelegt und nach Übertragen der Filtermarkierungen auf die Plattenunterseite 15 Minuten bei 4 °C gehalten. Die Filter konnten dann abgezogen und mit der Phagen-

seite nach oben auf frische Bodenagarplatten übertragen werden, die dann mit den Filtern für 12-15 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Bei einem Plaquedurchmesser von 1-2 mm wurden sie dann zur Hybridisierung vorbereitet (s. Abschnitt 2.8.3.). Die Matrizenplatten wurden mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt.

b) Für die Vereinzelung eines Phagen aus einer definierten Subpopulation der Genbank in einem Agarosepfropf konnte auf die Amplifikation auf den Filtern verzichtet werden. Die durch Diffusion der Phagen aus Agarosepfropf entstandene Phagensuspension wurde so verdünnt, daß auf eine 90 mm durchmessende Agarplatte etwa 100-300 Phagen ausplattiert werden konnten. Gemäß dem Protokoll von Benton und Davis (105) wurden die sterilen Filter ohne Imprägnierung mit Bakterien nach 15 Minuten Kontaktzeit von den Matrizenplatten (s.o.) der verdünnt ausplattierten Phagen abgezogen und wie in Abschnitt 2.8.3. beschrieben direkt zur Hybridisierung vorbereitet.

2.8.3. Plaquehybridisierung und Handhabung der identifizierten Klone (106)

Nach der Übertragung der Phagen auf die Nylonmembran nach einem der oben genannten Verfahren wurden die Filter mit der Phagen-seite nach oben auf mehrere Lagen Whatman 3 MM Papier gelegt, das mit Denaturierungslösung getränkt war. Nach 10 Minuten wurden sie für weitere 10 Minuten auf einen gut mit Neutralisierungslösung durchfeuchteten Stapel Whatman 3 MM Papier gelegt. Anschließend wurden die Filter an der Luft getrocknet und die freigesetzte Phagen-DNA dann 1 Stunde bei 80 °C im ölpumpenvakuum an die Membran gebunden.

Während die Filter mit den amplifizierten Phagen anschließend 2 Stunden bei 42 °C zur Entfernung von Bakterientrümmern in HSTE-Puffer gewaschen wurden, konnten die Filter ohne Phagenamplifikation direkt vorhybridisiert werden.

Denaturierungslösung	:	0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung	:	3 M Na-Azetat, pH 5.5
HSTE-Puffer	:	50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS

Zur Vorhybridisierung wurden die Filter in Glasschalen 155 mm Innendurchmesser gelegt und in 4 ml RNA-Vorhybridisierungslösung (s. Abschnitt 2.7.3.) pro 100 cm² Membranfläche mindestens 4 Stunden bei 55 °C leicht geschüttelt.

Anschließend wurden die Filter in eine zweite Schale mit 2 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membranfläche transferiert und mindestens 48 Stunden bei 55 °C unter leichtem Schütteln hybridisiert. Die Hybridisierungslösung entsprach in ihrer Zusammensetzung der der Vorhybridisierungslösung und enthielt zusätzlich die denaturierte, radioaktiv markierte Probe. Schließlich wurden die Membranen zweimal 10 Minuten in einem großen Volumen 1x SSC/0.1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal 45 Minuten mit 0.1x SSC/0.1% SDS bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen.

Die getrockneten Filter wurden, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, autoradiographiert. Die auf dem Film auftauchenden Signale wurden über die Markierungen von Filter und Phagenplatte definierten Phagenplaques oder Regionen auf der Phagenplatte zugeordnet, einzelne Plaques mit dem spitzen Ende, Regionen mit dem stumpfen Ende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und die Agarpröpfe in 1 ml SM-Puffer mit einem Zusatz von 2% (v/v) Chloroform steril bei 4 °C aufbewahrt.

2.9 Isolierung von Phagen-DNA

2.9.1. Herstellung eines primären Phagenlysats

Zur Amplifikation von Phagen aus einem Phagenstock wurden 100 µl CM-Lösung (s. 2.8.1.), 100µl einer logarithmisch wachsenden DP 50 sup F Kultur und 100µl einer Phagensuspension (ca. 10¹⁰ Phagen) vereinigt und 15 Minuten bei 37 °C zur Präadsorption der Phagen an die Bakterien inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml SCYDT-Medium wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C in einem sterilisiertem Reagenzglas geschüttelt.

Die nach der lytischen Infektion verbliebenen Bakterientrümmere ließen sich abzentrifugieren (Minifuge GL, 5300 rpm, 5500 x g, 15 Minuten, 4 °C) und der Überstand nach Zusatz von Chloroform auf eine Endkonzentration von 2% (v/v) bei 4°C lagern. Diese primären Lysate hatten einen durchschnittlichen Phagentiter von 10¹⁰ pfu/ml.

2.9.2 Isolierung von Phagen-DNA aus primären Lysaten

Die Isolierung von Phagen-DNA aus primären Lysaten verlief im wesentlichen nach der Methode von Leder et al. (107). Die Änderungen bestanden darin, daß nach der Herstellung des Lysates (s. Abschnitt 2.9.1.) die Phagenpartikel durch Zugabe von 2/3 Volumina einer Lösung von 25% PEG und 2% M NaCl in SM-Puffer in

einer Stunde auf Eis ausgefällt und die Phagenköpfe bei 65 °C in Gegenwart von 0.5% SDS sowie 10 mM EDTA aufgesprengt wurden.

2.9.3. Isolierung der Phagen-DNA aus großen Lysaten

Zur Isolierung von Phagen-DNA aus großen Lysaten wurden 2.5 ml SM-Puffer, 2.5 ml einer logarithmisch wachsenden Q 358 Bakterienkultur und 10 µl eines primären Lysates (ca. 10⁸ pfu) 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, zu 250 ml SCYDT-Medium gegeben und 12-16 Stunden bei 37 °C im Warmluftinkubator geschüttelt. Waren die Bakterien nach diesem Zeitraum noch nicht lysiert, so wurden der Kultur noch einmal 250 ml SCYDT-Medium zugesetzt und weitere 3-4 Stunden inkubiert.

Die weitere Aufarbeitung verlief im wesentlichen wie bei Maniatis et al. (108) beschrieben. Die Abweichungen bestanden darin, daß die Chloroformextraktion dreimal wiederholt wurde, die Dichtegradientenzentrifugation für 90 Minuten bei 133000x g, 28000 rpm, 25 °C und die Gleichgewichtszentrifugation mit einer CsCl-Lösung der Dichte 1.479 g/ml in einem Vertikalrotor für mindestens 5 Stunden bei 240000x g (50000 rpm, 25 °C, TV 865-Rotor) erfolgte. Zur Freisetzung der Phagen-DNA wurden die Phagenpartikel nach der Ultrazentrifugation in Anwesenheit von 0.5 mg/ml Proteinase K gegen SDS-Puffer dialysiert.

SDS-Puffer : 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2.5 mM EDTA,
0.5% SDS

2.10 Hybridisierungstechniken

2.10.1. "Dot-Blot-Hybridisierung" und "Hybridisierungs-Selektionsverfahren"

Etwa 1 cm² große Nylonmembranfilter wurden mit 1-50µg DNA in 1 µl-Schritten beladen und nach jedem Schritt mit einem Föhn getrocknet. Die weitere Hybridisierung erfolgte wie in Abschnitt 2.8.3. beschrieben in einem Volumen von 300 µl/Filter.

Für das "Hybridisierungs-Selektions"-Verfahren wurden die Membranen nach der Hybridisierung gewaschen (s. 2.8.3.), die Filter in 100 µl TE/0.5% SDS pro Filter gegeben und 5 Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Sofort anschließend wurde das Eluat abgenommen und mit 50 µg Glykogen versetzt.

Die so eluierte, radioaktive Probe konnte nach einer Fällung mit Ethanol in einem Polyacrylamidgel analysiert werden.

2.10.2. Hybridisierung nach Southern

Der Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nylonmembranen erfolgte nach dem Verfahren von Southern (109-111). Die Immobilisierung der DNA auf der Membran erfolgte wie in Abschnitt 2.8.3. beschrieben.

Die anschließende Hybridisierung erfolgte für 18-24 Stunden bei 65 °C wie in Abschnitt 2.7.3. beschrieben. Als Hybridisierungspuffer wurde allerdings eingesetzt:

(Vor-)Hybridi- : 5x SSC, 5x Denhardt's, 0.1% SDS, 0.25 mg/ml
sierungspuffer. E.Coli Nukleinsäuren

2.11. Isolierung von Fragment-DNA zur Subklonierung

2.11.1. Restriktionsanalyse

Die Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte soweit, wie möglich, in einem standardisierten Basispuffer. Dieser enthielt: 50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM MgCl₂ und 50 mM NaCl.

Wurden Enzyme benutzt, die stark abweichende Puffer benötigten, so wurden die vom Hersteller empfohlenen Lösungen eingesetzt. Partielle Verdauungen wurden durch Beendigung der Reaktion nach reduzierten Inkubationszeiten erzielt.

Die Proben wurden dann mit 1/4 Volumen 5x DNA-Probenpuffer versetzt und die entstandenen DNA-Fragmente in 0.8-2%igen Agarose-horizontalgelen in 1x TEB aufgetrennt.

Durch Zusatz von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid sowohl zur Gellösung als auch zum Elektrophoresepuffer ließ sich die DNA im Gel anfärben und so unter UV-Licht sichtbar machen.

1x TEB : 1.08% Tris-Base, 0.55% Borsäure, 20 mM EDTA
5x DNA-Proben-: 20% Ficoll, 0.01% Bromphenolblau, 0.01% Xylen-
puffer Cyanol FF, 100 mM EDTA

2.11.2. Verdauung mit der Exonuklease Bal 31

Die Behandlung von DNA-Fragmenten mit Exonuklease Bal 31 er-nach den Empfehlungen des Herstellers in Übereinstimmung mit dem bei Maniatis et al. (112) beschriebenen Verfahren.

Ein typischer Ansatz erfolgte in 170 µl Gesamtvolumen bei 37 °C mit 7.5 U Bal 31/100 pmol Enden, entsprechend z.B. 135 µg der mit dem Enzym Bam HI restringierten Plasmid-DNA des Subklons p7SK/132. In Abhängigkeit von der Länge des abzudauenden DNA-Stückes

wurden dem Reaktionsgemisch in entsprechend angepaßten Zeitintervallen Aliquots entnommen, diese zum Beenden der Reaktion mit 1/4 Volumen 100 mM EGTA vermischt und phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.). Nach einer Ethanolfällung in Gegenwart von 0.3 M Na-Azetat, pH 5.5 konnten die entstandenen DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die gewünschten Fragmentgrößen wurden aus den entsprechenden Gelregionen eluiert.

2.11.3. Elution von DNA nach Tautz et al. (113)

Die DNA-Fragmente wurden in einem möglichst niederprozentigen Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment unter einer langwelligen UV-Lampe (350 nm) ausgeschnitten. Nach Äquilibrieren des Agaroseblockes in 1-2 ml einer Lösung aus 0.3 M Na-Azetat, pH 7/ 1 mM EDTA für 15-20 Minuten wurde das kurz abgetrocknete Gelstück in ein 500 µl Eppendorfreaktionsgefäß überführt, welches in der Spitze ein kleines Loch und darüber einen ca. 2 mm hohen Pfropf aus silanisierter Glaswolle besaß. Nach 15 Minuten in flüssigem Stickstoff konnte das Reaktionsgefäß mit dem tiefgefrorenen Gelstück in ein zweites, 2.5 ml fassendes, deckellooses Eppendorfggefäß eingesetzt werden. Die DNA ließ sich aus der, durch das Einfrieren zerstörten Gelmatrix durch eine Zentrifugation (9000x g, Eppendorfsentrifuge, 15 Minuten, Raumtemperatur) mit der Gelflüssigkeit herauspreßen. Nach einer Ethanolfällung in Gegenwart 0.3 M Na-Azetat, pH 5.5, 10 mM MgCl₂ und 0.1% Essigsäure konnte die DNA direkt zur Ligation eingesetzt werden.

2.11.4. Elution mit NA 45-Membranen (114, 115)

Die in 2-5 mm breite Streifen zerschnittene Membran wurde zur Aktivierung des membrangebundenen Ionenaustauschers 10 Minuten in 10 mM EDTA, pH 7 sowie 10 Minuten in 0.5 N NaOH geschüttelt. Anschließend wurden die Streifen solange in H₂O gewaschen, bis der pH-Wert der Waschlösung im Neutralbereich lag. Nach der Auftrennung der jeweiligen DNA-Fragmente in einem Agarosegel wurde das gewünschte Fragment bei 100 V auf die Membran aufelektrophoretisiert. Nach beendeter Elektrophorese wurde die Membran kräftig in L-NET gewaschen, mit Fließpapier abgetrocknet, nochmals in kleinere Streifen (1 mm x 2-5 mm, je nach Gelhöhe) zerschnitten und mit mindestens 200 µl H-NET 40 Minuten bei 68 °C inkubiert.

Die die DNA enthaltende Lösung wurde nach beendeter Elution abgenommen, durch silanierte Glaswolle abzentrifugiert (s. Ab-

schnitt 2.11.3), die DNA in Gegenwart von 10 µg/ml Glykogen mit Ethanol präzipitiert, anschließend phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.) und erneut aus 0.3 M Na-Azetat mit Ethanol gefällt. Die so erhaltene DNA konnte für alle Folgereaktionen, einschließlich der *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

L/ H-NET: 20 mM Tris-HCl, pH 8; 0.1 mM EDTA; 0.15 M/ 2 M NaCl

2.11.5. Elution mit der "Biotrap-Apparatur"

Diese Apparatur wurde zur Elution großer DNA-Mengen, etwa 20 µg und mehr, eingesetzt. Die, die DNA enthaltenden Gelblöcke wurden mit einem Skalpell in kleine Würfel zerteilt. Diese Gelstücke wurden dann in die Elutionskammer der Apparatur gegeben und die DNA innerhalb von 2 Stunden bei 200 V in 1x TEB in eine etwa 400 µl fassende Auffangkammer hinein elektrophoretisiert.

Ausführliche Beschreibungen sowie der Zusammenbau dieser Apparatur können dem Begleitheft des Herstellers (Schleicher & Schüll, Dassel) entnommen werden.

Die das DNA-Fragment enthaltende Lösung wurde zur Entfernung des DNA-gebundenen Ethidiumbromids, wie bei Maniatis et al. (116) beschrieben, dreimal mit TE-gesättigtem Isobutanol extrahiert. Die nach der Ethanolfällung erhaltene DNA konnte ebenfalls direkt zu allen Folgereaktionen, so auch zur *in vitro* Transkription, eingesetzt werden.

2.12. Klonierung in verschiedene Vektoren

2.12.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Die zur Subklonierung verwendeten Bakterien der E.Coli K12-Derivate C 600 (117) und JM 103 (118) konnten beide nach dem gleichen Verfahren zur Einschleusung von Plasmid-DNA vorbereitet werden.

Die Bakterien wurden auf Minimalplatten selektioniert, bevor sie zur Herstellung kompetenter Zellen eingesetzt wurden. Anschließend wurde mit kleinen Abweichungen die bei Maniatis et al. (119) beschriebene CaCl_2 -Methode eingesetzt. Bakterienzellen einer über-Nacht-Kultur wurden 100fach mit LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer Dichte von 0.4-0.5 OD_{578} im Warmluftinkubator bei 37 °C geschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 2-4 °C.

Die Zellen konnten durch eine Zentrifugation (GSA-Rotor, 15 Minuten, 3000 rpm, 1500x g) geerntet und anschließend in einem halben Volumen eiskalter 0.1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert werden. Nach 20 Minuten in Eiswasser wurde erneut zentrifugiert (s.o.) und die Bakterien in 1/50 Volumen eiskalter 0.1 M CaCl_2 -Lösung vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von sterilem Glycerin auf eine Endkonzentration von 25% wurden die Bakterien in 200 μl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

LB-Medium (1 l) : 10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, pH 7.4, autoklavieren
M9-Medium (1 l) : 7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0.5 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 3 g KH_2PO_4 , pH 7.4, autoklavieren, nach Abkühlen auf 45 °C 10 ml 20%ige Glucose (sterilfiltriert), 2 ml 1 M MgCl_2 , 0.1 ml 1 M CaCl_2 zusetzen
JM 103 Minimalmedium: M9-Medium mit 5 mg/ml Thiamin
C 600 Minimalmedium: M9-Medium mit 5 mg/ml Thiamin, 50 mg/ml Threonin, 50 mg/ml Leucin

Für Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium 1.25% Bacto-Agar zugesetzt.

2.12.2 Vorbereitung der Vektor-DNA und Ligation

Die Vektor-DNA wurde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen möglichst kurz inkubiert und die Vollständigkeit der Verdauung auf einem Agarosegel überprüft. Wies die Vektor-DNA anschließend kohäsive Enden auf, so wurden diese dephosphoryliert, um bei der anschließenden Ligation die Rezirkularisierung der Vektor-DNA zu unterdrücken (120).

Nach Inaktivierung des Restriktionsenzyms erfolgte die Phosphatase-Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Boehringer Mannheim GmbH, Phosphatasequalität für die Molekularbiologie) in 50 mM Tris-HCl, pH 9; 0.1 mM EDTA.

20-100 ng der durch anschließendes Phenolisieren (s. Abschnitt 2.2.2.) und Fällen mit Ethanol aufgereinigten, linearisierten Vektor-DNA wurden in einem zweifachen molaren Überschuß mit der Fragment-DNA mindestens 4 Stunden bei 16 °C in einem Volumen von 30 μl ligiert. Die Pufferbedingungen der Reaktion waren: 66 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl_2 , 10 mM DTT und 1mM ATP.

2.12.3. Klonierung in die Plasmid-Vektoren pUC 8 und pAT 153

Beide Plasmid-Vektoren konnten nach der gleichen Methode in in die jeweils zugehörigen Wirtsbakterien eingeschleust werden. Zur Transformation der Bakterien wurde ein Aliquot des Ligationansatzes zu 200 µl kompetenten Bakterien (s. Abschnitt 2.12.2.) gegeben, die Mischung mindestens 30 Minuten bei 4 °C und dann zur Expression der jeweiligen Antibiotikaresistenz ebenfalls mindestens 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte ein Aliquot des Ansatzes entweder, bei Verwendung des pAT 153-Vektors (96), auf Ampicillin- oder Tetracyclin-haltige LB-Platten (100µg/ml Ampicillin bzw. 25µg/ml Tetracyclin) oder, bei Verwendung des pUC 8-Vektors (121), auf LB-Agarplatten gegeben werden, die neben 100 µg/ml Ampicillin zusätzlich 150 µg/ml Xgal und 200 µg/ml IPTG enthielten. Der Zusatz von Xgal und IPTG führte zu einer Farbreaktion, die auf der Bildung von Dibromdichlorindigo durch β -Galactosidase beruht und die Unterscheidung von Fremd-DNA tragenden Plasmiden und Ursprungsplasmiden ermöglicht. Daher benötigt der das lac z' -Fragment tragende pUC 8 Vektor als Wirtsbakterium den Stamm JM 103, während für das pAT 153 Plasmid das E.Coli Derivat C 600 genügt.

2.12.4. Klonierung in den Bakteriophagen M13 (122, 123)

M13 ist ein filamentöser, in E.Coli wachsender Bakteriophage mit zirkulärer, einzelsträngiger DNA. Da bei diesem Vektor, wie bei dem Plasmid pUC 8 (121), die "MCS" (Klonierungssequenz mit Schnittstellen für verschiedene in der Vektor-DNA sonst nicht auftretende Restriktionsenzyme) im Leserahmen in das Lac z' -Fragment aus dem bakteriellen Lac Z Gen insertiert ist, ist eine Selektion Fremd-DNA tragender RF-DNA nach der gleichen Farbreaktion wie bei dem Plasmid pUC 8 möglich. Die Transfektion des daher benutzten E.Coli Derivates JM 103 mit einzel- oder doppelsträngiger Phagen-DNA erfolgte wie die in Abschnitt 2.12.3. beschriebene Transformation mit Plasmid-DNA. Allerdings konnte auf die Antibiotikaresistenzexpression verzichtet werden. Da aber Phagen-DNA eingesetzt wird, wurden die kompetenten Bakterien nach der Transfektion in 3 ml LB-Deck-Agar mit 0.15 mg/ml X-Gal und 0.2 mg/ml IPTG ausplattiert. Die Verwendung von M13-Vektoren zur Klonierung bietet die Möglichkeit, aus infektiösen Phagenpartikeln, die in nach der Infektion in das Kulturmedium aus den Bakterien ausgeschleust werden, einzelsträngige, zirkuläre DNA einfach aus dem Überstand einer Bakterienkultur zu präparieren. Darüber hinaus kann die RF-DNA

wie Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen der gleichen Kultur isoliert werden.

2.13. Isolierung von M13-DNA

2.13.1. Isolierung von M13 RF-DNA

Für die Isolierung der M13 RF-DNA sowohl im kleinen als auch im großen Maßstab wurden gleiche Volumina einer Phagenstamm- bzw. hochtitrigen Phagenlösung und einer JM 103 Übernachtskultur 100-fach in LB-Medium verdünnt und 6-8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem in Abschnitt 2.4. beschriebenen.

2.13.2. Nachweis in M13-DNA mit unterschiedlicher Orientierung einklonierter DNA-Fragmente

Infolge des Lebenszyklus des M13-Phagen entspricht die einzelsträngige M13-DNA immer dem (+)-Strang der RF-DNA, sodaß die einzelsträngige DNA zweier verschiedener Phagen immer dann miteinander hybridisiert werden kann, wenn die einklonierte Fragment-DNA des ersten Phagen entgegengesetzt orientiert ist zu der im zweiten Phagen.

Zur Hybridisierung wurden je 20 µl Überstand einer Kultur des einen Klon mit der gleichen Menge Überstand eines zweiten, das gleiche Fragment tragenden Klon vermischt und nach Zugabe von 4 µl TESS 1.5 Stunden bei 68 °C inkubiert. Die Proben konnten nach Zusatz von 8 µl Probenpuffer auf 0.8%igen Agarosegelen bei 90 V/ 40 mA analysiert werden.

TESS: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 0.1 mM EDTA, 10 mM NaCl

Probenpuffer: 70% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau

2.13.3. Isolierung einzelsträngiger M13-DNA

1.3 ml Überstand einer Phagenkultur wurden mit 150 µl PN-Lösung gut durchmischt und nach 15 Minuten auf Eis ließen sich die präzipitierten Phagen abzentrifugieren (9000x g, 10 Minuten, Raumtemperatur, Eppendorffzentrifuge). Das Sediment wurde in 200 µl TE, pH 8/ 0.3 M Na-Azetat resuspendiert und anschließend phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.). Die einzelsträngige DNA konnte mit Ethanol gefällt werden und ließ sich nach Trocknen des mit Ethanol gewaschenen Sedimentes in 15 µl TE resuspen-

dieren. Die Lagerung bis zur Verwendung als Matrizen-DNA für Sequenzierungsreaktionen erfolgte bei -20 °C.

PN-Lösung: 25% PEG 6000, 3 M NaCl

2.14. DNA-Sequenzanalyse nach der Methode von Sanger und Nicholson

2.24.1. Sequenzierung nach der Methode von Sanger und Nicholson von M13-Klonen

Die DNA-Sequenzanalysen erfolgten nach der Didesoxy-Strangterminations-Methode von Sanger et al. (124)

Für die Sequenzierung wurden 5 µl "Primer-Mix" und 5 µl einzelsträngige DNA , bei 68 °C 2 Stunden hybridisiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 1 µl α-³²P-dATP (10 µCi, spez. Akt.: 400 Ci/mmol) und 1 µl Klenow-Enzym (1 U) versetzt. Von dieser Lösung wurden für jede der 4 Sequenzierungsreaktionen 3 µl mit je 2 µl des entsprechenden Sequenzierungsgemisches vereinigt und dieser Ansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl "Chase-Mix" und weiteren 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 5 µl Ld-Puffer (s. Abschnitt 2.1.3./b) beendet und 1 µl dieser Probe nach Deanaturieren auf einem 0.2 mm dicken Sequenziergel (s. Abschnitt 2.2.3.) analysiert.

Die benutzten Sequenzierungsgemisch hatten folgende Zusammensetzung:

	A	G	C	T
0.5 mM				
dATP	5	5	5	5
dTTP	250	250	250	250
dCTP	250	250	12.5	250
dGTP	250	12.5	250	250
10 mM				
ddATP	5	-	-	-
ddTTP	-	-	-	25
ddCTP	-	-	5 (4)	-
ddGTP	-	10 (8)	-	-
TE	500	500	500	500

Die in Klammern angegebenen Werte wurden für Gemische benutzt,

die zur Sequenzierung von mehr als 400 bp dienen. Die dNTPs und ddNTPs wurden in TE, pH 8 (s .Abschnitt 2.2.4.) gelöst.

Primer-Mix: 1 µl M13-Primer (17 nt), 1 µl TM (100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM MgCl₂, 3 µl H₂O

Chase-Mix: 0.25 mM dNTPs in TE, pH 8

2.14.2. Sequenzierung nach der Methode von Sanger und Nicholson von pUC 8-Klonen

Zur Sequenzierung mußte der "Primer" zunächst an die Plasmid-DNA hybridisiert werden. Dazu wurde die DNA in 5'-Richtung aufwärts hinter der einklonierten Fremd-DNA mit einem geeigneten, möglichst in der "MCS" schneidenden Restriktionsenzym linearisiert und die DNA nach Abtrennen aus dem Restriktionsansatz 5 Minuten in H₂O₁₀₀ bei 95 °C erhitzt. Sofort anschließend wurde der "Primer" an die dann einzelsträngig vorliegende Sequenzierungsstart-Sequenz in 10 Minuten bei 68 °C anhybridisiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Abschnitt 2.14.1. beschrieben.

2.15. In vitro Transkription

2.15.1. Präparation eines S-100 Zellextraktes

Zur Präparation eines S-100 Zellextraktes wurde mit kleinen Abweichungen das Verfahren von Weil et al. (125) angewendet. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

HeLa S₃ Zellen wurden abzentrifugiert (170x g, 10 Minuten, 1000 rpm, GSA-Rotor), in 1/10 Volumen Earles-Puffer (76), bezogen auf das ursprüngliche Suspensionsvolumen, resuspendiert, erneut sedimentiert (750x g, 10 Minuten, Heraeus Christ Minifuge GL) und das Zellvolumen (PCV: packed cell volume) bestimmt.

Nach Aufnehmen des Zellsedimentes in 5 "PCV" an Puffer A wurde diese Suspension zum Schwellen der Zellen 10 Minuten in Eis gestellt. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) ließ sich das Sediment in 2 "PCV" an Puffer A resuspendieren. Die Zellen konnten dann in einem Dounce-Homogenisator durch 15-20 kräftige Stöße mit dem B-Pistill lysiert werden. Dabei konnte die Vollständigkeit der Lyse unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft werden.

Das Homogenat wurde anschließend mit 1/8 Volumen, bezogen auf das jetzt vorliegende Gesamtvolumen des Lysats, an Puffer B versetzt und je nach Extraktmenge entweder im SW 60- oder im SW 41-

Rotor zentrifugiert (100000x g, 60 Minuten, 32000 rpm für den SW 60-Rotor). Der Überstand ließ sich unter Zurücklassung der oben schwimmenden Lipidschicht vorsichtig abnehmen und nach Dignam et al. (126) zum Schockfrieren in flüssigem Stickstoff für die anschließende Lagerung in 200 µl Aliquots bei -70 °C mit 0.13 Volumen 86%igem Glycerin versetzen, entsprechend einer Endkonzentration von 10% Glycerin.

Puffer A: 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂,
0.5 mM DTT
Puffer B: 0.3 M HEPES-KOH, pH 7.9; 1.4 M KCl, 30 mM MgCl₂,
0.5 mM DTT

Das DTT wurde erst unmittelbar vor Verwendung dem jeweiligen Puffer zugesetzt. Die Proteinkonzentration im Extrakt wurde nach der Methode von Bradford et al. (127) bestimmt.

2.15.2. In vitro Transkription mit einem S-100 Zellextrakt

Die in vitro Transkription folgte im wesentlichen der Methode von Weil et al. (125).

Danach enthielt jeder Ansatz standardmäßig bei einem Endvolumen von 50 µl:

16 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 70 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, je 0.6 mM ATP, GTP, CTP; 1 µg/ml α-Amanitin, 5-10 µCi α-³²P-UTP (spez. Akt.: 600 Ci/mmol), 20 µl Extrakt und 1.5 µg exogene DNA.

Die Transkription wurde durch Zugabe des Extraktes gestartet, erfolgte für 60-90 Minuten bei 30 °C und ließ sich durch Zusetzen von 1 Volumen an PK-Puffer (0.5 mg/ml Proteinase K, 1 mg/ml t-RNA, 0.4% SDS in TE) beenden. Nach einer Stunde bei 37 °C konnten die Proben phenolisiert werden. Die Abtrennung der nicht inkorporierten, radioaktiv markierten Nukleotide erfolgte durch zweimalige Ethanolfällung in Gegenwart von 2.5 M NH₄-Azetat.

Anschließend ließ sich die in TE/0.2% SDS resuspendierte Probe durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysieren.

2.16. Ribonuklease T₁ - "Fingerprints"

2.16.1. Inkubation von RNA mit Ribonuklease T₁

Die Zerlegung von RNA in für sie spezifische Oligonukleotide erfolgte mit Ribonuklease T₁ und wurde mit Material durchge-

führt, das entweder in vivo oder in vitro durch Transkription radioaktiv markiert wurde.

Für in vivo radioaktiv markierte 7S K RNA wurden 4.2×10^8 Zellen wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben mit 3.5 mCi ^{32}P -Orthophosphat in 350 ml phosphatarmen Medium 14 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellfraktionierung erfolgte gemäß Abschnitt 2.2.2. Für die Isolierung hochreiner 7S K RNA aus der Gesamt-RNA der partikelfreien Zytoskelettfraktion wurde SDS-PAGE wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben, angewendet und die RNA aus dem Gel eluiert (s. Abschnitt 2.2.4.).

Hochreine, in vitro markierte 7S K RNA ließ sich durch Transkription mit zellfreiem Extrakt (s. Abschnitt 2.15.2.) synthetisieren. Für die Reaktion wurden allerdings sowohl 10 μCi α - ^{32}P -UTP als auch 10 μCi α - ^{32}P -GTP (spez. Akt.: 600 Ci/mmol) in Gegenwart von 1 μM UTP eingesetzt. Die RNA wurde wie oben beschrieben unter Verwendung von SDS-PAGE isoliert.

Die in Gegenwart von 5 μg tRNA zweimal umgefällten Proben wurden nach Gross et al. (128) bei einem Gesamtvolumen von 17 μl in 60 mM Tris-HCl, pH 8; 3 Stunden bei 37 °C mit 1.5 U RNase T₁ (Sankyo-Calbiochem) inkubiert, dann lyophilisiert und in 1 μl H_2O wieder gelöst.

Sofort anschließend erfolgte die Auftrennung auf Zelluloseazetat-Folien.

2.16.2. Hochspannungselektrophorese auf Zelluloseazetat-Folien

Die "Fingerprint"-Analysen wurden wie bei Brownlee und Sanger (129) beschrieben, nach einem von Gross et al. (128) modifizierten Verfahren durchgeführt.

In der ersten Dimension wurden die Oligonukleotide auf Zelluloseazetat-Folien bei 5000 V (7.5 mA) elektrophoretisch in einer Hochspannungselektrophoresekammer (Savant Instruments) nach Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt.

Dazu wurde die Folie mit Denaturierungspuffer angefeuchtet, überschüssiger Puffer entfernt, der Elektrophoresestartpunkt (18 cm von einem Streifenende entfernt) getrocknet, die Probe (1 μl) dort punktförmig aufgetragen und etwa 1 Stunde elektrophoretisiert, bis der auf beiden Seiten neben der Probe aufgetragene Markierungs-Farbstoff Xylen Cyanol FF 8 cm vom Startpunkt entfernt war.

Sofort anschließend erfolgte die Homochromatographie.

Elektrophoresepuffer: 5% Essigsäure, 0.5% Pyridin, 1 mM EDTA, mit Pyridin auf pH 3.5 titriert

Denaturierungspuffer: 7 M Harnstoff, 5% Essigsäure, 1 mM EDTA,
mit Pyridin auf pH 3.5 titriert

Markierungsfarbstoff: 1% Xylen Cyanol FF, 1% Methylrot, 1%
Fuchsinäure.

Der Harnstoff wurde vor Verwendung mit Aktivkohle 2 Stunden zur
Entfernung von NH_4OCN bei Raumtemperatur gerührt und die Aktiv-
kohle dann auf einer Al_2O_3 -Säule abgetrennt.

2.16.3. Homochromatographie

In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung durch Homochro-
matographie nach dem Verfahren von Silberklang et al. (130).
Die Auftrennung erfolgt hier nach dem Molekulargewicht der Oligo-
nukleotide durch Chromatographie in aufsteigender Richtung.
Dazu wurde zunächst ein 15 mM sog. "Homomix" durch Hydrolyse (20
Stunden, 65 °C) von 30 g Hefe-RNA/100 ml Mix mit 15 mM KOH in
Gegenwart von 7M Harnstoff hergestellt. Die Beendigung der Hydro-
lyse erfolgte durch anschliessendes Titrieren mit Essigsäure auf
pH 4.7.

Zur Chromatographie wurden die Oligonukleotide von den Zellu-
loseazetatstreifen auf DEAE-Zellulose-Dünnschichtplatten (20 x
40 cm, HR 2/15, Macherey Nagel) transferiert und bei 65 °C in
12 Stunden, bis der Markierungsfarbstoff 5-7 cm vom oberen Plat-
tenrand entfernt war, mit 100 ml 15 mM "Homomix" als Laufpuffer
aufgetrennt. Nach dem Trocknen der Platten konnten die verschie-
denen Oligonukleotide durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung einer zur 7S K RNA homologen, genomischen DNA-Sequenz

3.1.1. Isolierung eines Subklons mit einer 7S K RNA-homologen Sequenz

Für die Isolierung eines menschlichen, für die 7S K RNA kodierenden Gens konnte am Anfang der vorliegenden Untersuchung auf mehrere Charon 4A-Phagen zurückgegriffen werden, die aus einer von T. Maniatis (100, 101) hergestellten Bibliothek menschlicher Gene stammten (131).

Diese Klone waren aus 140000 ausplattierten Phagen ausgewählt worden, weil sie nach der Hybridisierung mit in vitro ^{32}P -markierter, partiell hydrolysierter 7S K RNA in der Autoradiographie die Stärksten von 114 erhaltenen Signalen zeigten.

Da die eingesetzte Sonde aus 7S K RNA homologen Ribo-Oligonukleotiden mit einer durchschnittlichen Länge von nur 25-50 nt bestand, waren diese Signale infolge der angewendeten Standardhybridisierungsbedingungen (50% Formamid, 42 °C, 5xSSC) relativ schwach. Nach einem Hybridisierungs-Selektions-Experiment mit ^{32}P -markierter 7S K RNA, die in vitro durch Transkription in isolierten HeLa S₂ Zellkernen synthetisiert wurde (31) und einem weiteren mit in vivo ^{32}P -markierter 7S K RNA zeigten nur 7 dieser Klone eine Hybridisierung (131).

Zur weiteren Untersuchung auf ein funktionelles 7S K RNA Gen wurde der Phage ausgewählt, der aufgrund der Signalintensität eine DNA-Sequenz tragen sollte, die im Vergleich zu der in den übrigen untersuchten Klonen die wahrscheinlich höchste Homologie zur 7S K RNA aufwies.

Da der für die 7S K RNA codierende Bereich relativ klein gegenüber dem 15-20 Kb Einschub menschlicher DNA in das Phagengenom ist, wurde zur weiteren Analyse die Phagen-DNA mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Pst I, Ava I, Bam HI verdaut und die Fragmente mit der zur 7S K RNA homologen DNA-Sequenz durch "Southern Blot"-Analyse (s. Abschnitt 2.10.2) identifiziert. Von diesen wurde für die weiteren Untersuchungen das 1.8 Kb lange Ava I-Restriktionsfragment ausgewählt und nach Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym (s. Abschnitt 2.5.2.) in die Sma I-Restriktionsschnittstelle des Plasmidvektors pUC 8 subkloniert (s. Abschnitt 2.11.).

Die weitere Restriktionsanalyse (Abb. 1) dieses Subklones mit der Bezeichnung phK/VI zeigte, daß einige Restriktionsschnittstellen, die nach einer bereits publizierten cDNA-Restrik-

tionskarte (43) nachweisbar sein sollten, in dem zur 7S K RNA homologen Bereich fehlten. Der Vergleich der Restriktionskarte dieses Subklons mit der zum publizierten cDNA-Klon gehörenden Sequenz (M. Melli, persönliche Mitteilung) ergab weiterhin, daß die fehlenden Schnittstellen im 3'-Bereich jener cDNA lagen.

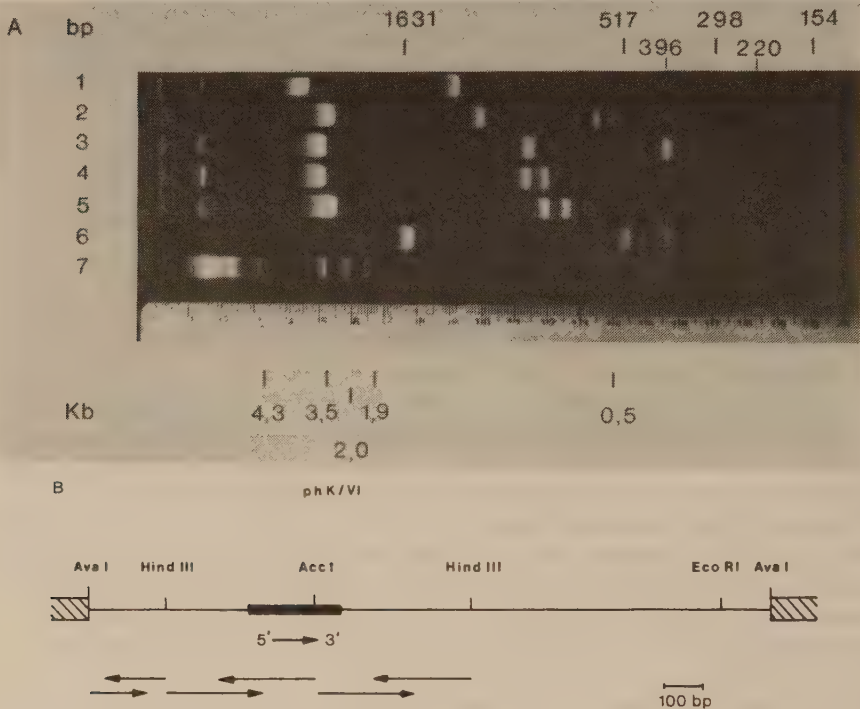


Abb. 1. zeigt in Teil A die in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetrennten Restriktionsfragmente der isolierten Plasmid-DNA des Subklons phK/VI. Die Plasmid-DNA wurde dabei über folgende Restriktionsansätze kartiert:
 Spur 1: Acc I; Spur 2: Acc I + Eco RI; Spur 3: Acc I + Hind III; Spur 4: Hind III; Spur 5: Eco RI + Hind III; Spur 6: Längenstandard 1 (pAT 153-DNA mit $Hind^I$ I verdaut); Spur 7: Längenstandard 2 (λ (wt)-DNA mit Eco RI + $Hind$ III verdaut).
 Teil B zeigt die Restriktionskarte des Subklons phK/VI, die daraus abgeleitete Sequenzierungsstrategie (Pfeile unter der Restriktionskarte) und die aus der Sequenz resultierende Anordnung des zur 7S K RNA homologen DNA-Bereiches (schwarzer Balken in der Restriktionskarte).

Dieser Befund konnte auf zwei mögliche Erklärungen zurückgeführt werden. Entweder lagen in der Sequenz der Restriktionsschnittstellen Punktmutationen vor oder der gesamte 3'-Bereich der 7S K RNA homologen Sequenz fehlte. Während die Punktmutationen noch durch eine eventuell mögliche Mikroheterogenität innerhalb der 7S K RNA-Gene zu erklären war, so hätte das Fehlen der 3'-Region

der kodierenden Sequenz auf ein Pseudogen hingedeutet. Daher wurde ein Teil des Subklons nach der in Abb. 1/Teil B gezeigten Strategie sequenziert.

3.1.2. Sequenzierung des Subklons phk/VI

Zur Sequenzanalyse wurde der Subklon zunächst mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Acc I zerlegt, die Fragmente in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, die beiden 0.6 bzw. 1.2 Kb langen Eco RI-AccI Fragmente aus dem Gel eluiert (s. 2.11.4.) und jeweils mit dem Restriktionsenzym Hind III weiter zerlegt. Die hierbei entstehenden Fragmente wurden erneut in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt und nach der Elution aus dem Gel (s. 2.11.3.) in die jeweils zugehörigen M13 mp 10 bzw. mp 9 Vektoren einkloniert (s. 2.12.4). Die anschließende Sequenzierung erfolgte dann nach der Methode von Sanger und Nicholson.

Diese Analyse ergab, daß der isolierte genomische Klon offensichtlich ein Pseudogen darstellte, dessen 7S K RNA-homologe Region (s. Abb. 2.) eine Länge von 242 bp aufwies, wobei 33 bp gegenüber der cDNA-Sequenz verändert waren, entsprechend einer Homologie von 88% zur cDNA. Darüber hinaus war das Pseudogen am 5'-Ende um 2 bp und am 3'-Ende um 87 bp verkürzt.

Ein Vergleich der Pseudogenesequenz mit der cDNA-Sequenz (Melli, persönliche Mitteilung) zeigt, daß von den Basenaustauschen allein 12 im Sequenzbereich zwischen den Positionen +75 und +115 liegen; dies sind mehr als ein Drittel aller veränderten Basen in einem Sequenzbereich von 40 bp.

Wie aus Abb.2. zu entnehmen ist, wird die zur 7S K RNA homologe Region direkt von zwei 21 bp langen, nahezu identischen Sequenzen ("direct repeats") flankiert, ein charakteristisches Merkmal mobiler DNA-Sequenzen. Derartige Sequenzen integrieren über einen bislang unbekannten Mechanismus an unterschiedlichen Stellen in ein Genom und duplizieren dabei einen Teilbereich der DNA, in die das mobile Element inseriert wurde.

Der Vergleich der beiden "direct repeats" zeigt 2 Basenaustausche, die wahrscheinlich durch Mutation entstanden sind. Daher kann angenommen werden, daß die Integration dieses Pseudogens vor vergleichsweise langer Zeit erfolgte. Bemerkenswert erscheint dabei auch, daß diese direkten Sequenzwiederholungen einige Basen der Endsequenzen des Pseudogens mit einbeziehen.

Die von Melli et al. (44) beschriebenen Alu-Sequenzen in der näheren Nachbarschaft von 7S RNAS K-Pseudogenen konnten hier weder in der 5'- noch in der 3'-flankierenden Region des Pseudogens nachgewiesen werden. Dies liegt möglicherweise darin be-

gründet, daß in beiden Richtungen nur 270 bzw. 380 bp der flankierenden Regionen sequenziert wurden und die Alu-Sequenzen weiter von dem Pseudogen entfernt liegen.

```

phK/VI      ACTTACCTTT AGGAAGAGGT ACTGTCCGAC ACGAGAGACG AAAGAAGGTG
            TCTAATGTAA CTTGACTTGA AGAGGGACTA CCACTGAGGA GTCCGGGGGT
            CACTGATGAA GTACCCCGAC AACTACCCAT CCCGGGAAAC GAGATCCAAG
            TAATCGGGTA TACGAGAGAG ACTCAAAGTC AAAAGACAGA GAAGAAGCCC
            CGACTACAAA GACGAAGGAA GGTGGAAGGG TCGAGGGAAA AGATTAGGTA

phK/VI      ACGATTAATA GACGACCACA AACCTGGAAC TCTCGAACAA ACCTCCAAGA
c7SK        3'-. .GATGCA AGAGGATGTT TACCTGGAAC TCTCGAACAA ACCTCCAAGA
            TCGTTCGCCC GTGCCTCGA TGAACATATG GGAAGTGGTT TCTGACCAGG
            **** * *** **** * *** **** * *** **** * *** ****
            TCGTCC CCC TCGCGTCGA TGAGCATATG GGAAGTGGCT TCTGACCAGG

            AGGAGATAGG CCCTACCACT AGGAGAAGTT GGTTCGCGTG TCTAAGTCCT
            ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * *
            AGGAGATAGC CCCTACCAGC AGGAGAAGCT GGCTCGCGCG TCGAAGCCCT

            CCCTGTGTGT ACCTCGTACA TTCA-CCCTT CCC-TGTGGG TGGATCGGTC
            ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * *
            CCCTCGGTGT ACCTCGC CA CTCCCTCCTT CCCCTGTGGC GGATCGGTC

            GGTCTAGTAG ACTTAGTTGG GACCATTAGT TCCCCCACTG TCTACAGTGT
            ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * *
            GGTCTAGTCG GCTTAGTTGG GACCGCTAGT TACCCCACTG TCTACAGCGT

            CGGTCTAGTG G-AGTGTACA TAGACGACCC ACAACTGGT CTAGTGTGAC
            ***** * * *****
            CGGTCTAGCG GGAGTGTAGG-5'

phK/VI      AAAGTCGCGT ATCGAGTCGC AGACCCAGCT CCCGAAAGGG TACTCATTTT
            CGACGGGTGC GGAGTCTAAT GAGTCGAACT TACGACGGAG AAAATCGAGT
            CGAATACGTC GAGTAAAGGA CCAAGAATCG AATCAAGATC CTCATCAAGT

            CTCATCAAAA TCTGTCAGAG TCATCTTCGAA

```

Abb. 2, zeigt die Sequenz des 7S K RNA Pseudogens im Subklon phK/VI sowie einen Teil der flankierenden DNA-Region im Vergleich mit der 7S K RNA cDNA-Sequenz (44). "Direct Repeats" sind unterstrichen, Sequenzhomologien wurden durch Sterne wiedergegeben.

3.2. Isolierung eines zur 7S K RNA homologen cDNA-Klons aus einer cDNA-Bibliothek

3.2.1. In vitro Polyadenylierung der isolierten 7S K RNA

Um eine vollständige cDNA-Kopie einer RNA zu erhalten, muß der Startpunkt für die reverse Transkription am 3'-Ende der RNA liegen. Die doppelsträngige Startsequenz für die Reverse Transkriptase kann durch Hybridisierung eines zum 3'-Ende der RNA homologen Oligodesoxyribonukleotid an die RNA gebildet werden. Für die polyadenylierte mRNA kann daher Oligodesoxythymidin eingesetzt werden.

Da die 7S K RNA keine poly-(A)-Sequenz besitzt, konnte der herkömmliche Start der cDNA-Synthese nicht direkt erfolgen. Um die Hybridisierung mit Oligodesoxythymidin trotzdem durchführen zu können, mußte diese RNA in vitro polyadenyliert werden. Diese Modifikation der eingesetzten RNA wurde nach dem Verfahren von A. Sippel (92) durchgeführt (s. Abschnitt 2.6.1.).

Für die Polyadenylierung wurden insgesamt 8×10^8 HeLa S₂-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben fraktioniert, die RNA aus der Zytoskelettfraktion in einem 6-15%igen SDS-Gradientengel (s. Abschnitt 2.2.3.) aufgetrennt und die die 7S K RNA enthaltenen Gelstücke nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Nach der Elution der RNA aus den Gelstücken (s. Abschnitt 2.2.4.) konnten noch 13 µg RNA wiedergewonnen werden. Die Mengenbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption des Eluates bei 260 nm. Ein Vergleich zeigt dabei, daß etwa ein 1/40stel dieser Menge in der Zytoskelettfraktion aus 1.5×10^8 Zellen enthalten ist (Abb. 3A, Spur 1 u. 2). Darüber hinaus zeigt sich, daß die eluierte 7S K RNA hochrein isoliert werden konnte (s. Abb. 3A, Spur 2), d.h. die Kontamination durch Fremd-RNA lag unter der Nachweisgrenze.

Die Polyadenylierung erfolgte in 8 Ansätzen mit je 1 µg gelgereinigter 7S K RNA pro Ansatz bei reduzierter Temperatur wie in Abschnitt 2.6.1. beschrieben. Wie Abbildung 3B zeigt, verläuft die Reaktion auch bei einer Temperatur von 22 °C extrem schnell, so daß schon nach 4 Minuten (Spur 3) durchschnittlich 50-60 Adenosinmonophosphatreste an den 3'-Terminus der RNA anpolymerisiert wurden. Wie die Kinetik zeigt, verbleibt die Poly-(A)-Polymerase oft am Startmolekül, sodaß die Poly-(A)-Kette eines RNA-Moleküls mit fortlaufender Reaktionszeit immer weiter verlängert wird. Der Reaktionsstart an einem neuen RNA-Molekül erfolgt offensichtlich nur sehr selten. Eine Temperaturerhöhung (nicht gezeigt) er-

brachte keine Änderung dieses Verhaltens, im Gegenteil sie führte zur nahezu quantitativen Degradation der eingesetzten RNA. Eine genauere Betrachtung von Abb. 3B macht darüber hinaus deutlich, daß auch bei 22 °C mit zunehmender Reaktionszeit eine signifikante Degradation der eingesetzten RNA einsetzt.

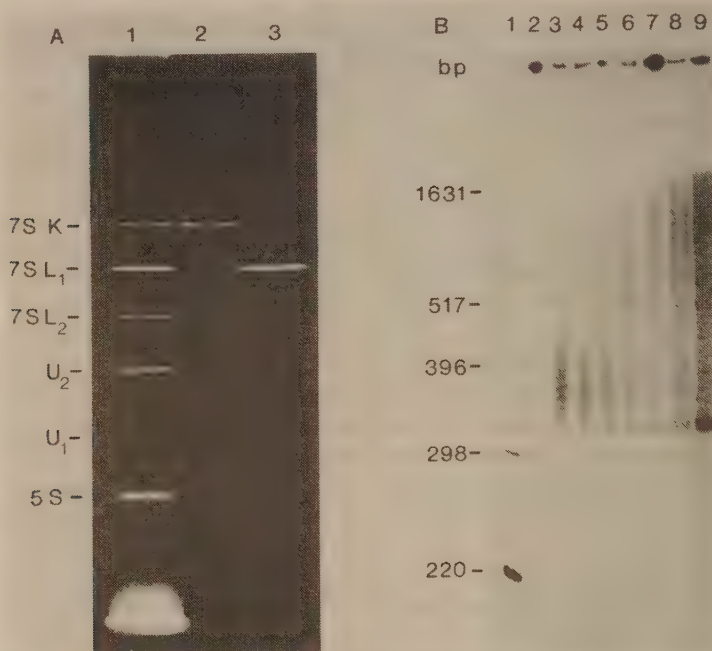


Abb. 3. zeigt in Teil A den Vergleich der eluierten 7S K RNA mit zytoplasmatischer RNA aus der Zytoskelettfraktion von 1.5×10^6 Zellen, die gemäß den Abschnitten 2.2.2. - 2.2.4. isoliert und in einem 6-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel analysiert wurde. Es bedeuten im einzelnen:

Spur 1: RNA der Zytoskelettfraktion, Spur 2: eluierte 7S K RNA (1/40stel Aliquot der gesamten, eluierten Menge), Spur 3: eluierte 7S L RNA (1/40stel Aliquot der gesamten, eluierten Menge)

Teil B zeigt die Kinetik zur *in vitro* Polyadenylierung der 7S K RNA. Für diese Kinetik wurde 1 µg RNA mit 0.9 U Poly-(A)-Polymerase bei 22 °C für unterschiedliche Zeiten inkubiert:

Spur 1: Längenstandard (pAT 153-DNA mit Eco RI und Hinf I geschnitten, die Fragmentenden wurden gemäß Abschnitt 2.5.1. mit γ - 32 P-ATP radioaktiv markiert), Spur 2-9: Polyadenylierung nach verschiedenen Zeiten, Spur 2: 0 Minuten, Spur 3: 4 Minuten, Spur 4: 7 Minuten, Spur 5: 10 Minuten, Spur 6: 14 Minuten, Spur 7: 19 Minuten, Spur 8: 30 Minuten, Spur 9: 50 Minuten. Expositionszeit: 1 Stunde ohne Verstärkerrolle.

Da die Poly-(A)-Polymerase in Gegenwart von RNase-Inhibitoren in ihrer Aktivität stark vermindert ist, limitierte diese Nukleasekontamination die maximal einsetzbare Enzymmenge, sodaß die Anzahl der polyadenylierten Moleküle weder durch Erhöhung der Reaktionstemperatur oder der Reaktionszeit noch durch die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge vergrößert werden kann.

Dementsprechend wurde die Reaktion mit 0.9 U/ 10 pmol 7S K RNA

für 4 Minuten bei 22 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten 12% aller eingesetzten RNA-Moleküle polyadenyliert werden, wenn man eine durchschnittliche Poly-(A)-Kettenlänge von 50-60 nt zugrundelegt. Somit konnten zur cDNA-Synthese insgesamt etwa $0.12 \times 8 \mu\text{g} = 0.96 \mu\text{g}$ poly(A)-7S K RNA eingesetzt werden.

3.2.2. Synthese und Klonierung einer doppelsträngigen, zur 7S K RNA homologen cDNA

Synthese und Klonierung der ds-cDNA erfolgte mit einigen Abweichungen nach der Methode von Gubler und Hoffman (93) wie in den Abschnitten 2.6.2 - 2.6.5 beschrieben. Diesem Verfahren lagen insgesamt vier Teilschritte zugrunde. Nach dem Start durch Anhybridisieren eines Oligo-(dT)₁₂₋₁₈- "Primers" an die in vitro polyadenylierte RNA folgte die reverse Transkription zur Synthese des ersten Stranges. Anschließend erfolgte die Synthese des zweiten Stranges in Gegenwart von E.Coli Polymerase I und den vier Desoxyribonukleotiden unter den Ionenbedingungen einer "Nick-Translation", wobei mit RNase H größere Bereiche der RNA in dem RNA-DNA-Hybrid degradiert wurden, während parallel dazu der entsprechende DNA-Strang neusynthetisiert wurde. Die hierbei entstehende ds-cDNA konnte direkt mit (dG)-Homopolymeren versehen und in einen linearisierten, mit (dC)-Homopolymeren versehenen Vektor einhybridisiert werden, sodaß dadurch ohne Ligationsreaktion wieder ein zirkuläres Plasmid entstand, das sich zur Transformation kompetenter Bakterien einsetzen ließ. Infolge der in vitro Polyadenylierung, die zu einer entscheidenden Reduktion an für die cDNA-Synthese verfügbarer RNA führt, war auch hier die Ausbeute an cDNA pro eingesetzter RNA und die Länge an entstandenem cDNA-Produkt von wesentlicher Bedeutung. Daher wurden für die Synthese des ersten Stranges Bedingungen gewählt, die zu besonders langen Transkripten führen, d.h., die Reaktion verlief in Gegenwart von 50 mM KCl und 10 mM MgCl₂. Zur Erhöhung der Ausbeute an neusynthetisierter cDNA pro eingesetzter in vitro polyadenylierter 7S K RNA verlief die Reaktion in Gegenwart eines 10fachen Überschusses an oligo-(dT)₁₂₋₁₈- "Primer" und besonders hoher Konzentrationen an Desoxyribonukleotid.

Wie Abb.4A zeigt, führten diese Reaktionsbedingungen bei der Synthese des ersten Stranges zu Transkriptlängen im Bereich von 300-400 nt mit dem Schwerpunkt bei 300 nt (Spur 2). Bei der Synthese des zweiten Stranges ist eine deutliche Längenreduktion zu verzeichnen, die wahrscheinlich auf das Zusammenspiel von RNase H und DNA-Polymerase I zurückzuführen ist (Spur 3).

Die Ausbeute des ersten und des zweiten Stranges wurde wie in Abschnitt 2.6.2. beschrieben bestimmt. Berücksichtigt man die Effizienz der in vitro Polyadenylierung, so wurden aus 1 µg 7S RNA K etwa 120 ng polyadenylierte RNA erhalten. An säure-präzipitierbarem Material wurden nach der reversen

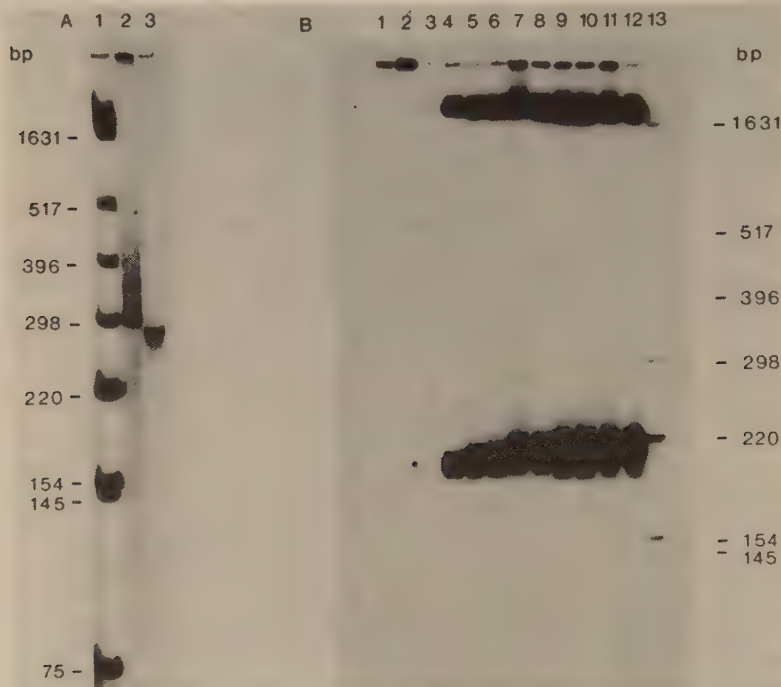


Abb. 4 zeigt in Teil A die Synthese ds-cDNA. Dazu wurden ca. 120 ng in vitro polyadenylierte 7S RNA wie in den Abschnitten 2.6.2. und 2.6.3. beschrieben revers transkribiert. Die Synthese des ersten und des zweiten Stranges erfolgte dabei jeweils in Gegenwart von 40 µCi (α - 32 P)-dGTP. Für die radioaktive Markierung des zweiten Stranges wurde der erste Strang zunächst ohne radioaktiv markiertes Nukleotid synthetisiert und dann die Synthese des zweiten Stranges in Gegenwart von radioaktiv markiertem Nukleotid gestartet. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel (s. Abschnitt 2.6.2 bzw. 2.6.3.) aufgetrennt. Dabei bedeuten im einzelnen: Spur 1: Längsstandard (pAT 150-DNA mit Eco RI und Hinf I restringiert und anschließende radioaktive Markierung der Fragmentenden mit (γ - 32 P)-ATP), Spur 2: Synthese des ersten Stranges, Spur 3: Synthese des zweiten Stranges. Expositionszeit: 2 Stunden ohne Verstärkerfolie.

In Teil B ist die Kinetik der Synthese der (32P)-homopolymeren Enden des mit Sph I linearisierten Vektors dargestellt. Die Reaktion erfolgte wie in Abschnitt 2.6.4. beschrieben in Gegenwart von 40 µCi (α - 32 P)-dGTP (50 µmol/l). Von dem Ansatz wurden zu verschiedenen Zeiten 2 µl Aliquots entnommen, das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C inaktiviert, die Vektor-DNA dann mit dem Enzym Eco HI restringiert und die Fragmente in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel analysiert. Die Eco HI-Erkennungssequenz liegt 190 bp von der Sph I-Erkennungssequenz entfernt, sodass zur Längenbestimmung der Homopolymeren ein 190 bp langes Eco HI-Sph I-Ausgangsfragment eingesetzt werden konnte. Es bedeuten im einzelnen: Spur 1: 0 Minuten, Spur 2: 4 Minuten, Spur 3: 7 Minuten, Spur 4: 10 Minuten, Spur 5: 15 Minuten, Spur 6: 20 Minuten, Spur 7: 25 Minuten, Spur 8: 30 Minuten, Spur 9: 37 Minuten, Spur 10: 45 Minuten, Spur 11: Längsstandard wie in Teil A. Expositionszeit: 2 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Transkription aus 1 µg 7S K RNA umgerechnet 37 ng neusynthetisierte, einzelsträngige cDNA gebildet. Nach der Synthese des zweiten Stranges konnten dann pro µg eingesetzter 7S K RNA 22 ng ds-cDNA erhalten werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 18.3%. Zur Klonierung der synthetisierten cDNA wurde sowohl sie selbst als auch der mit Sph I linearisierte pAT 153-Plasmid-Vektor mit homopolymeren Enden versehen.

Das Restriktionsenzym Sph I wurde dabei aus zwei Gründen ausgewählt. Zum einen werden an mehr als 90% der überhängenden 3'-Enden (dC)-Reste addiert, sodaß die Reaktion hier wesentlich effektiver als an 5'-überhängenden oder stumpfen Enden verläuft (95). Zum anderen wird nach der Insertion der mit Oligo-(G) versehenen cDNA die Sph I-Erkennungssequenz auf beiden Seiten wiederhergestellt, sodaß die cDNA später ohne Vektorsequenzen aus dem Plasmid wieder herausgeschnitten werden kann.

Hohe Transformationsraten der rekombinanten Moleküle werden nur dann erhalten, wenn die komplementären Homopolymerreste etwa gleiche Länge aufweisen. Zu große Längenabweichungen erzeugen verzweigte Sekundärstrukturen (97), die die spätere Replikation stark beeinträchtigen. Da die Synthese von (dG)-Homopolymeren selbstlimitierend verläuft, d.h., die Reaktion bricht nach der Addition von 25 dG-Resten ab, wurden die Reaktionsbedingungen zur Synthese der (dC)-Homopolymeren so gewählt, daß ebenfalls durchschnittlich nicht mehr als 25 dC-Reste an das jeweilige DNA-Ende anpolymerisiert wurden. Dies konnte dadurch erreicht werden, daß die Reaktion in hohem Enzymüberschuß gegenüber den angebotenen DNA-Enden erfolgte. Unter der Voraussetzung, daß dann jeder DNA-Terminus mit einem Enzymmolekül abgesättigt ist, die Reaktion also an allen Termini gleichzeitig startet, limitierte dann die eingesetzte Desoxyribonukleotidmenge die Länge der (dC)-Homopolymeren (95).

Die Reaktionsbedingungen wurden aus einer Kinetik abgeleitet (s. Abb. 4B), wobei zur genaueren Analyse der Zahl der addierten dC-Reste der mit Homopolymeren versehene, Sph I linearisierte Vektor nach Hitzeinaktivierung der Terminalen Transferase mit dem Enzym Bam HI restringiert wurde. Diese Restriktion lieferte zwei Fragmente, von denen sich am kleineren, 190 bp langen Fragment die Länge der addierten Homopolymere relativ genau abschätzen ließ.

Wie Abb.4B zeigt, erfolgt bereits nach 25 Minuten (Spur 7) keine weitere Kettenverlängerung, die durchschnittliche Länge der Homopolymeren liegt bei etwa 25-30 dC-Resten/ Homopolymer und es werden, wie die Ausbeutebestimmung ergab, nur noch angefangene Reaktionen mit dem restlichen, in der Lösung vorliegenden dCTP

beendet. Insgesamt wurden pro pmol 3'-überhängender Termini 24.6 pmol dCTP inkorporiert, entsprechend 98.5% mit (dC)₂₅-Homopolymeren versehener Enden.

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurden dann in jeweils einem Ansatz unter den ermittelten, in Abschnitt 2.6.4. beschriebenen Reaktionsbedingungen etwa 65 ng ds-cDNA mit (dG)- und 6 µg Sph I linearisierte Vektor-DNA mit (dC)-Homopolymeren versehen. Nach der gelelektrophoretischen Aufreinigung des mit (dC)-Homopolymeren versehenen Vektors lieferte diese Plasmid-DNA noch 300 - 500 Kolonien pro µg linearisiertem Plasmid. Die Transformations-effizienz lag dabei bei 6.5×10^5 Kolonien/ µg kovalent geschlossenem, zirkulärem Plasmid.

Zur Klonierung der cDNA wurden in 8 Ansätzen jeweils 400 ng Vektor-DNA mit 8 ng ds-cDNA, wie in Abschnitt 2.6.5. beschrieben, hybridisiert und diese nach der Transformation (s. Abschnitt 2.12.3.) auf 2 Nylonmembranfilter (Ø: 132 mm), wie in Abschnitt 2.7.1. beschrieben, ausplattiert. Insgesamt wurden zwischen 9000 und 12000 Kolonien erhalten, entsprechend 160000 Transformanten pro µg ds-cDNA. Daher wurde die Inkubationszeit der Filter bei 37 °C in Abwesenheit von Chloramphenicol auf 7 Stunden reduziert, um noch isolierte Einzelkolonien zu erhalten.

3.2.3. Differentielle Hybridisierungen der cDNA-Bibliothek

cDNA-Klone mit einer möglichst vollständigen Kopie der 7S K RNA ließen sich durch eine differentielle Kolonienhybridisierung nachweisen.

Diese Form der Hybridisierung wurde gewählt, da in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von A. E. Sippel (92) die Polyadenylierung häufig zu sehr langen poly(A)-Termini führte (Abb 3/B). Da bei einer reversen Transkription von RNA mit ausgeprägter Sekundärstruktur wie bei der 7S K RNA (Reddy et al., 1984) häufig cDNA-Kopien entstehen, die infolge des Syntheseabbruchs am 5'-Terminus stark verkürzt sind und die reverse Transkription der langen poly(A)-Termini möglicherweise ein entsprechend langes Transkript in der Gelanalyse (Abb. 4/A) hätte vortäuschen können, erfolgte zum Nachweis der cDNA-Klone mit relativ vollständiger Länge der cDNA die Überprüfung der Bibliothek mit einer Sonde, die aus dem 5'-terminalen Bereich des Pseudogens im Klon phK/VI stammte. Da die Sequenz dieser Sonde nur zu etwa 88% zur RNA-Sequenz homolog war und darüberhinaus nur 51 bp umfaßte, erfolgte eine Kontrollhybridisierung mit radioaktiv markierter 7S K RNA, sodaß artefizielle Hybridisierungssignale durch die 5'-Sonde erkannt werden konnten. Dabei ließ sich die RNA in vitro mit 3'-

(5'- α - 32 P)-Cytidindiphosphat radioaktiv markieren (s. Abschnitt 2.3.2.), während das Restriktionsfragment mit mit Polynukleotidkinase und (γ - 32 P)-ATP radioaktiv markiert wurde. Um Kontaminationen abzutrennen, wurde die für die Hybridisierung eingesetzte RNA nach der radioaktiven Markierung zusätzlich in einem denaturierenden, 6%igen Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgereinigt. Die radioaktiv markierte RNA konnte aus diesem Gel mit 68% Ausbeute eluiert werden (s. Abschnitt 2.2.4.).

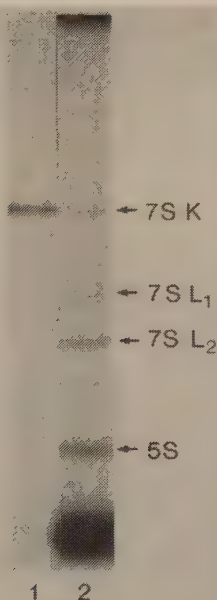


Abb. 5 zeigt den Vergleich von *in vitro* und *in vivo* radioaktiv markierter 7S K RNA.

Für die *in vitro* Markierung der RNA wurden 400 ng gelgereinigter 7S K RNA in einem Endvolumen von 30 μ l mit 6.75 U T₄-RNA-Ligase und 100 μ Ci 3'- 32 P-(5'- α -32P)-Cytidindiphosphat radioaktiv markiert (s. Abschnitt 2.3.2.). Die radioaktiv markierte RNA wurde dann in einem denaturierenden, 6%igen Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgereinigt, eluiert und ein 1/10 Aliquot in einem 6-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel analysiert (Spur 1).

Für die *in vivo* Markierung wurden 4.5x10⁷ HeLa S₃ Zellen mit 750 μ Ci 32 P-Orthophosphat, wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben, radioaktiv markiert, die RNA, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, isoliert und auf ein 6-15%iges SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetragen (Spur 2).

Expositionszeit des getrockneten Gels 60 Minuten ohne Verstärkerfolie.

Eine anschließende Analyse mit einem Aliquot der eluierten RNA in einem 6-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel zeigte, daß zur Hybridisierung hochreine, undegradierete 7S K RNA eingesetzt werden konnte (s. Abb. 5, Spur 2). Die Hybridisierung der Replika-Filter mit der radioaktiv markierten RNA erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3. beschrieben für 48 Stunden. Die eingesetzte Radioaktivitätsmenge betrug 1.8x10¹⁰ cpm/ml, entsprechend einer Gesamtmenge von 5x10¹⁰ cpm bei einer spez. Aktivität von 1.3x10⁶ cpm pro μ g 7S K RNA.

Als zweite spezifische Sonde fungierte das DNA-Fragment, das durch Restriktion des Pseudogens im Subklon pHK/VI mit dem Enzym Sau 3A an den Positionen +12 und +63 (s. Abb. 2), bezogen auf das erste Bsaenpaar der K-homologen Sequenz, erzeugt wird. Das dadurch entstehende 51 bp lange Restriktionsfragment stellt

somit eine spezifische Sonde für den 5'-terminalen Bereich einer vollständigen, zur 7S K RNA homologen cDNA dar. Ein Vergleich der Sequenz dieses Restriktionsfragmentes mit der cDNA-Sequenz von Melli et al. (44) zeigt, daß nur 6 bp von den 51 bp verändert sind, die Sonde also als relativ homolog gelten kann. Die Hybridisierung erfolgte dann mit einem zweiten Satz Replika-Filter (s. Abschnitt 2.7.1 und 2.7.2) für 48 Stunden in Gegenwart von 3.2×10^5 cpm/ml, entsprechend einer Gesamtmenge von 1.2×10^6 cpm bei einer spez. Aktivität von 2.2×10^6 cpm/pmol Fragment. Infolge der geringen Länge dieses Fragmentes von nur 51 bp wurde die Hybridisierungstemperatur auf 55 °C abgesenkt, um eine ausreichende Hybridisierungseffizienz zu gewährleisten. Die übrigen Bedingungen entsprachen denen für DNA-Hybridisierung, die in Abschnitt 2.10.2. beschrieben wurden.

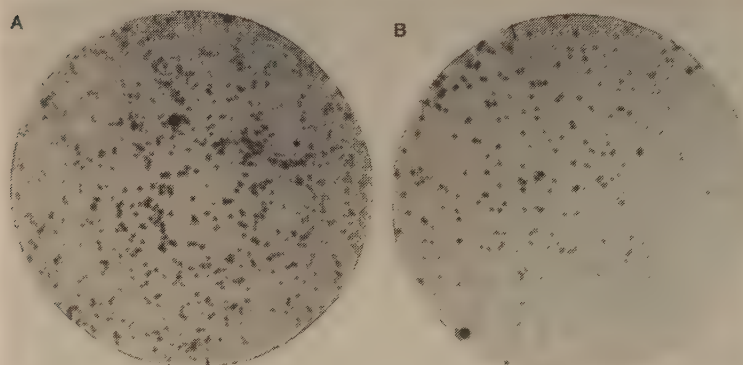


Abb. 6 zeigt den Vergleich zweier Replikas desselben Matrizen-Filters, die jeweils mit unterschiedlichen Sonden hybridisiert wurden. Die Replika-Filter wurden wie in den Abschnitten 2.7.1. und 2.7.2. beschrieben hergestellt und anschließend hybridisiert. Für die Hybridisierung mit der *in vitro* markierten RNA waren die Bedingungen: 5xSSC, 50% Formamid, 55 °C für 36 Stunden (Filter A), während die Hybridisierung mit dem Restriktionsfragment aus dem 5'-kodierenden Bereich des Pseudogens bei etwas veränderten Bedingungen erfolgte: 5xSSC, 55 °C für 48 Stunden (Filter B). Expositionszeit: 4 Tage mit Verstärkerfolie

Die Auswertung nach der Autoradiographie (s. Abschnitt 2.2.5.) ergab, daß, obwohl ein Teil der Signale nur eine geringe Intensität aufwies, mehr als 90% aller Bakterienkolonien eine zur 7S K RNA homologe cDNA-Kopie besaßen.

Der Vergleich zweier, jeweils mit den verschiedenen Sonden hybridisierter Replikas desselben Matrizen-Filters ergab, daß

auch in der nun ebenfalls publizierten cDNA-Sequenz von Melli et al. (44) auftraten. Diese Analyse lieferte mit den publizierten Daten übereinstimmende Ergebnisse und führte zu der in Abb. 7 dargestellten Restriktionskarte des ausgewählten cDNA-Klons pCK/III.

Die weitere Charakterisierung des isolierten Klons erfolgte durch Sequenzierung der einklonierten cDNA-Kopie der 7S K RNA. Dazu wurde die cDNA nach der Restriktion des Plasmids mit dem Enzym Sph I von der Vektor-DNA über ein 1.2%iges Agarosegel abgetrennt, aus dem Gel eluiert (s. Abschnitt 2.11.4.) und mit

```

pCK/III  CCCCCCCCCC CCCCCCCCGA TCTGGCTGCG ACATCTGTCA CCCCATTGAT
          ** *****
c7SK      GGAT GTGAGGGCGA TCTGGCTGCG ACATCTGTCA CCCCATTGAT

CGCCAGGGTT GATTTCGGCTG ATCTGGCTGG CTAGGCGGTG TCCCCTTCCT
*****
CGCCAGGGTT GATTTCGGCTG ATCTGGCTGG CTAGGCGGTG TCCCCTTCCT

CCCTCACC GC TCCATGTGCG TCCCTCCCGA AGCTGCGCGC TCGGTGGAAG
*****
CCCTCACC GC TCCATGTGCG TCCCTCCCGA AGCTGCGCGC TCGGTGGAAG

AGGACGACCA TCCCCGATAG AGGAGGACCG GTCTTCGGTC AAGGGTATAC
*****
AGGACGACCA TCCCCGATAG AGGAGGACCG GTCTTCGGTC AAGGGTATAC

GAGTAGCTGC GCTCCCCTGC TAGAACCTCC AAACAAGCTC TCAAGGTCCA
*****
GAGTAGCTGC GCTCCCCTGC TAGAACCTCC AAACAAGCTC TCAAGGTCCA

TTTGTAGGAG AACGTAGGGT AGTCAAGCTT CCAAGACTCC AGACGGGGGG
*****
TTTGTAGGAG AACGTAGGGT AGTCAAGCTT CCAAGACTCC AGACACATCC

GGGGGGGGGG GGGGGGGG-- -----
AAATGAGGCG CTGCATGTGG CAGTCTGCCT TTCTTTT

```

Abb. 8: Vergleich der sequenzierten cDNA des aus der cDNA-Bibliothek isolierten Klons pCK/III mit der von Melli et al. (44) publizierten Sequenz für die 7S K RNA aus HeLa S₂-Zellen. Homologe Bereiche sind durch Sterne gekennzeichnet. Bei beiden Sequenzen wurde der nicht kodierende DNA-Strang in 5'-3'-Richtung dargestellt.

Enzymen Acc I bzw. Taq I weiter zerlegt. Die dabei entstehenden Restriktionsfragmente wurden erneut in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, eluiert (s. Abschnitt 2.11.3.) und in die entsprechend vorbereiteten M13-Vektoren einkloniert. Die anschließende Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Sanger et al. (s. Abschnitt 2.14.1.).

Der Vergleich (Abb. 8) der analysierten Sequenz mit der des von Melli et al. (44) publizierten cDNA-Klons (c7SK) zeigt, daß die hier isolierte cDNA von der Position +12 bis zur Position +294 reicht, damit eine Länge von 282 bp erreicht. Die Ursache für das Fehlen der 5'-terminalen Sequenz ist dabei auf das Syntheseverfahren für den zweiten Strang der cDNA zurückzuführen.

Wie in Abb. 8 zu sehen ist, stimmen beide Sequenzen zwischen den Positionen +12 und +294 vollständig miteinander überein. Auch die Länge der an die cDNA des Klons pCK/III addierten Homopolymeren entspricht mit 18 (dC)- bzw. 24 (dG)-Resten den Werten, die nach den ausgetesteten Reaktionsbedingungen zu erwarten waren (s. Abschnitt 3.2.2.)

Erstaunlicherweise fehlt aber die 3'-terminale Sequenz in der isolierten cDNA, obwohl die Synthese des ersten Stranges durch die Hybridisierung des oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primers an die in vitro polyadenylierte 7S K RNA eingeleitet wurde, sodaß die Synthese am 3'-Ende der RNA hätte beginnen müssen.

Wie aber schon Abb. 4/A zeigt, erfolgte die Längenreduktion schon bei der Synthese des zweiten Stranges.

Berücksichtigt man außerdem, daß während der in vitro Polyadenylierung durchschnittlich etwa 40 bis 70 Adenin-Reste an die 7S K RNA addiert wurden, so lag die Gesamtlänge der Matrize für die Synthese des ersten Stranges bei etwa 370 bis 400 nt. Diese Sequenz wurde korrekt revers transkribiert, wie der Vergleich von Abb. 3/B und Abb. 4/A deutlich zeigt, da die gleichen Längenverteilungen bei den Proben zu erkennen sind.

Hieraus folgt aber, daß die 3'-terminale Verkürzung um durchschnittlich etwa 50 bis 100 bp während der Synthese des zweiten Stranges auf eine einzelstrangspezifische Exonuklease mit 3'-5'-Aktivität zurückgeführt werden kann.

Es erscheint wenig wahrscheinlich, daß eine derartige Nuklease in das System zusätzlich als Verunreinigung eingebracht wurde, sodaß diese Verkürzung wohl eher auf die eingesetzte DNA-Polymerase I zurückzuführen ist, da sie ebenfalls eine derartige Exonuklease ("proof-reading") besitzt.

3.3. Isolierung von 7S K RNA homologen Sequenzen aus einer menschlichen, in X-Phagen klonierten Genbibliothek

3.3.1. Identifizierung der zur 7S K RNA homologen Sequenzen in der Genbibliothek unter selektiven Bedingungen

In Übereinstimmung mit den publizierten Daten (44) zeigten die bisherigen negativen Klonierungsergebnisse (131), daß das menschliche Genom zwar einige tausend Pseudogene, aber offensichtlich nur ein oder wenige Gene für die 7S K RNA enthält. Diese Pseudogene, deren typischer Vertreter die im Subklon phK/VI vorliegende Sequenz darstellt, zeigen nach Melli et al. (44) folgende Gemeinsamkeiten:

Etwa 9 von 10 isolierten Pseudogenen sind am 3'-Terminus um durchschnittlich 90 bp verkürzt; die K-Sequenz im Subklon phK/VI ist um 87 bp am 3'-Terminus verkürzt. Die übrigen homologen Sequenzen sind entweder am 5'-Terminus oder gar nicht verkürzt. Die Mutationen sind über den gesamten, zur 7S K RNA homologen Bereich verteilt; zum Beispiel zeigt die K-Sequenz des Subklons phK/VI überall im gesamten Sequenzbereich von 242 bp verteilt diese Basenaustausche, abgesehen von den 12 zwischen den Positionen +75 bis +105.

Um die Anzahl der in der Autoradiographie auftretenden Signale aus der Hybridisierung der Pseudogene erheblich zu reduzieren, erfolgte die Hybridisierung der Genbibliothek in Gegenwart von 50% Formamid bei einer Temperatur von 55 °C, da sich unter diesen Bedingungen die cDNA-Sonde gerade nur noch gegen sich selbst hybridisieren ließ (68, 132).

Um weiterhin zu gewährleisten, daß unter den überprüften Phagen wenigstens einer das gesuchte Gen enthält, wurden insgesamt etwa 600000 Phagen auf 20 großen Platten ($\varnothing$: 145 mm) nach der Methode von Woo et al. (s. Abschnitt 2.8.2.) ausplattiert. Als spezifische Sonde fungierte die DNA des cDNA-Klons pcK/III, die nach dem Verfahren der "Nick-Translation" (s. Abschnitt 2.5.3.) radioaktiv markiert wurde.

Die Hybridisierung der Phagenfilter erfolgte in 2 Glasschalen, die je 10 Filter enthielten, unter den in Abschnitt 2.8.3. beschriebenen Bedingungen mit 1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung für 77 Stunden.

Die Autoradiographie mit einer Verstärkerfolie lieferte nach einer Expositionszeit von 48 Stunden nur noch 18, zum Teil sehr intensive Signale (Abb. 9). Diese Signale wurden über die, auf die Platten übertragenen Filtermarkierungen bestimmten Orten auf der jeweiligen Platte zugeordnet, diese Region dann mit dem brei-

ten Ende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer (s. Abschnitt 2.8.1.) resuspendiert. Diese Klone wurden noch einmal vereinzelt und dann als isolierte Phagenplaques in 1 ml SM-Puffer mit 2% (v/v) Chloroform bei 4 °C aufbewahrt.

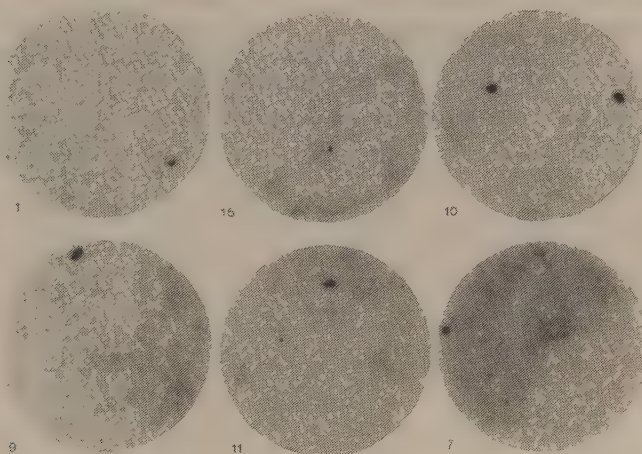


Abb.9 zeigt die Autoradiographie der Phagenfilter mit den höchsten Signalintensitäten. Diese unterscheiden sich trotz der hohen Hybridisierungsstringenz nicht von den Signalintensitäten, die bei der Hybridisierung unter normalen Stringenzbedingungen auftreten. Die geringe Anzahl erhaltener, derartig starker Signale entspricht der Voraussage, daß unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen nur noch sehr homologe Sequenzen erkannt werden. Expositionszeit der hybridisierten Filter: 48 Stunden mit Verstärkerfolie.

3.3.2. In vitro Transkription der aus der Genbibliothek isolierten Genkandidaten

Die isolierten Phagenklone wurden in primären Lysaten amplifiziert (s. Abschnitt 2.9.1.) und aus diesen die Phagen-DNA isoliert (s. Abschnitt 2.9.2.). Die anschließende Restriktionsanalyse mit den Enzymen Bam HI und Hind III zeigte, daß die 18 ursprünglich isolierten Phagen nur 5 verschiedenen Klonen angehörten. So traten die Klone λ CF1.1, λ CF9.1 und λ CF11.1 jeweils viermal, der Klon λ CF17.1 fünfmal und der Klon λ CF10.1 einmal auf.

Diese 5 verschiedenen Klone wurden dann in großen Lysaten vermehrt und nach der Isolierung der Phagen-DNA (s. Abschnitt 2.9.3.) durch eine in vitro Transkription mit zellfreiem Extrakt (s. Abschnitt 2.15.2) daraufhin überprüft, ob sie ein funktionelles 7S K RNA Gen beinhalteten.

Die in vitro Transkription von Phagen-DNA wurde an dieser Stelle der herkömmlichen Charakterisierung von Genkandidaten durch Restriktionsanalyse, Subklonierung und anschließender Sequenzierung vorgezogen, da der Nachweis einer in vitro transkribierten, 7S K RNA homologen RNA einen sehr wesentlichen Hinweis auf das Vorliegen eines funktionellen Genes geben sollte. Um aus der Vielzahl der erwarteten Transkripte - ein Phagenklon enthält immerhin etwa 15-20 Kb an insertierter genomische DNA und damit auch sehr wahrscheinlich mehrere, in vitro transkribierbare Alu-Sequenzen - ein 7S K RNA homologes Produkt eindeutig zu identifizieren, wurde neben der Transkriptgröße als zweites Merkmal die Homologie des Transkriptes zur 7S K RNA-cDNA in dem angewendeten Hybridisierungs-Selektions-Experiment ausgewählt.

Das zur Analyse verwendete Gelsystem wurde aus zwei Gründen eingesetzt. Zum einen beruht die Trennung in einem nicht denaturierenden Gradientengel nicht nur auf dem Molekulargewicht des untersuchten Partikels, sondern auch auf seiner Gestalt, so daß z. B. die verschiedenen Konformeren der 7S L RNA auf einem derartigen Gel aufgetrennt werden können. Zum anderen wurde die Taschengröße auf die Hälfte reduziert, um durch eine Akkumulation des neusynthetisierten 7S K RNA-Transkriptes auf einer kleineren Gelfläche die Signalintensität zu erhöhen, so daß mit nur wenigen Transkriptionsansätzen pro Klon die RNA sowohl direkt als auch durch ein Hybridisierungs-Selektions-Verfahren nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurden infolge des, im Vergleich mit dem Gesamtvektor, verhältnismäßig geringen Anteils der Sequenz, die für die 7S K RNA kodiert, für jeden Transkriptionsansatz 4 µg Phagen-DNA eingesetzt.

Die Transkription erfolgte dann bei 2 Ansätzen pro Klon wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben mit je 7 µCi (α -³²P)-UTP (spez. Akt. 600 Ci/mmol), in Gegenwart von 1 µg/ml α -Amanitin. Die beiden Ansätze eines Klons wurden anschließend vereinigt, 1/3 davon direkt in einem 6-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel analysiert und der Rest für ein Hybridisierungs-Selektions-Experiment mit 5 µg filter-gebundener, mit dem Enzym Sph I restringierter DNA des cDNA-Klons pCK/III eingesetzt (s. Abschnitt 2.10.1.). Die Hybridisierung verlief dabei in Gegenwart von 50% Formamid bei 55 °C für 48 Stunden in einem Volumen von 300 µl. Nach beendeter Hybridisierung wurden die Filter wie in Abschnitt 2.10.1. beschrieben weiter behandelt. Zur Kontrolle, ob die analysierten Transkripte von RNA-Polymerase III synthetisiert wurden, erfolgte eine weitere Transkription in Gegenwart von 200 µg/ml α -Amanitin unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen.

Von den 5 analysierten Klonen zeigten dann nur die Phagen λ CF1.1

und λ CF9.1 ein Transkript, das in der Länge mit der 7S K RNA übereinstimmte (s. Abb 10, Spuren 2 und 4) und das darüber hinaus auch eine sehr hohe Homologie zur 7S K RNA-cDNA aufwies, da die aus dem Hybridisierungs-Selektions-Experiment wiedergewonnenen, signifikanten Transkripte (s. Abb. 10, Spuren 13 und 14) unter sehr hoher Stringenz an die cDNA hybridisiert wurden.

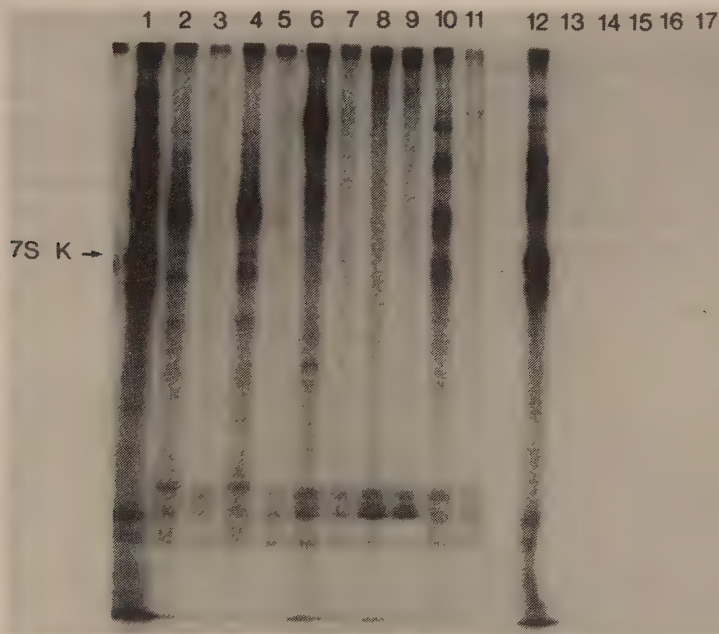


Abb. 10: zeigt die *in vitro* Transkription der aus der Genbibliothek aufgrund der Signalintensität isolierten Phagen. Die eingesetzte Phagen-DNA wurde dazu aus großen Lysaten (s. Abschnitt 2.9.3.) isoliert und unter den in Abschnitt 2.15.2. beschriebenen Bedingungen mit einem zellfreien Extrakt (s. Abschnitt 2.15.1.) transkribiert. Dabei wurden je Ansatz 4 μ g Phagen-DNA eingesetzt, um wegen der Vektorgroße noch Konzentrationen für den 7S K RNA Promotor zu erreichen, die eine nachweisbare *in vitro* Transkription zuließen. Die in den einzelnen Spuren analysierten Phagen waren:
 Spur 1: Längenstandard (*in vitro* Transkription eines X-Phagen, der ein Transkript in der Größe der 7S K RNA aufweist - s. Pfeil), Spur 2: λ CF1.1/1 μ g/ml α -Amanitin, Spur 3: λ CF1.1/200 μ g/ml α -Amanitin, Spur 4: λ CF3.1/1 μ g/ml α -Amanitin, Spur 5: λ CF9.1/200 μ g/ml α -Amanitin, Spur 6: λ CF10.1/1 μ g/ml α -Amanitin, Spur 7: λ CF10.1/200 μ g/ml α -Amanitin, Spur 8: λ CF11.1/1 μ g/ml α -Amanitin, Spur 9: λ CF11.1/200 μ g/ml α -Amanitin, Spur 10: λ CF17.1/1 μ g/ml α -Amanitin, Spur 11: λ CF17.1/200 μ g/ml α -Amanitin, Spur 12: Längenstandard aus Spur 1, Spur 13-Spur 17: durch Hybrid-Select mit der DNA des cDNA-Klons pCK/III isolierte RNA aus den Transkriptionsansätzen der Phagen: λ CF1.1 (Spur 13), λ CF9.1 (Spur 14), λ CF10.1 (Spur 15), λ CF11.1 (Spur 16) und λ CF17.1 (Spur 17).
 Expositionszeit: 52 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Darüber hinaus erfolgte keine Transkription der putativen 7S K RNA-Gene in Gegenwart von 200 μ g/ml α -Amanitin (s. Abb. 10, Spuren 3 und 5), so daß die hier analysierten Transkripte offensichtlich von RNA-Polymerase III produziert wurden.

Daher wurde angenommen, daß nur diese beiden Klone ein funktionelles, für die 7S K RNA kodierendes Gen besitzen. Der Vergleich aller Transkripte beider Klone zeigt, daß sie sich voneinander in der Größe nicht nachweisbar unterscheiden, so daß diese beiden Phagen bzw. die in sie insertierte, genomische DNA nur unwesentlich voneinander verschieden sein sollten. Demgemäß wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch diese beiden Klone eingesetzt.

3.3.3. Subklonierung der Genkandidaten

Da das gesuchte Gen sich nur über einen kleinen Sequenzbereich erstreckt, erwies es sich als sehr vorteilhaft, ein DNA-Fragment zu klonieren, daß neben dem Gen nur wenige hundert Basenpaare flankierender Sequenzen aufwies. Dazu wurde die DNA der beiden potentiellen Genkandidaten sowie ein weiteres Pseudogen (λ CF10.1) mit den Restriktionsenzymen Ava I, Bam HI, Bgl II, Cla I und Eco RI zerlegt und die Restriktionsfragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (s. Abschnitt 2.11.1).

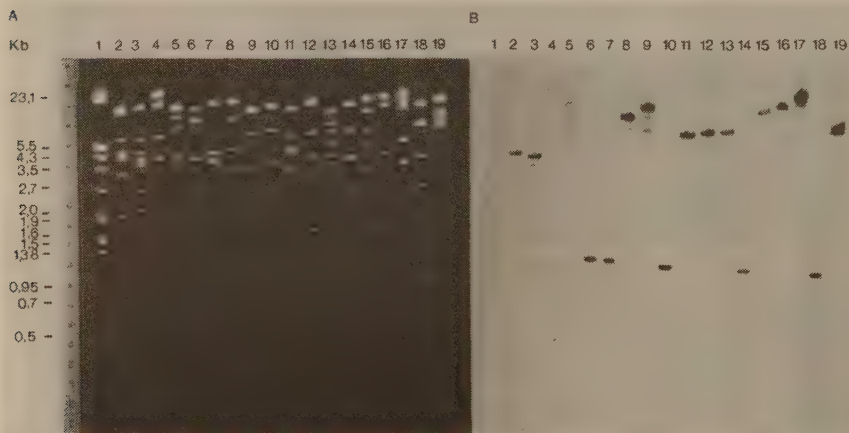


Abb. 11: DNA-Fraktionationsanalyse der Klone λ CF9.1 und λ CF10.1 zur Subklonierung von DNA-Fragmenten, die eine zur 7S K RNA homologe Sequenz tragen. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben. Teil B zeigt den entsprechenden "Southern Blot" der in dem Gel aufgetrennten Restriktionsfragmente. Der Transfer der DNA erfolgte wie in Abschnitt 2.10.2. beschrieben. Expositionszeit: 9 Stunden. In den einzelnen Spuren des Gels wurde die mit der folgenden Enzymen behandelte Phagen-DNA der Klone λ CF10.1 (Spur 1-4) und λ CF9.1 (Spur 5-19) aufgetrennt. Spur 1: Längenstandard (λ -DNA mit den Enzymen Eco RI, Hind III und Bpn I restringiert.), Spur 2: Eco RI + Cla I, Spur 3: Cla I + Bgl II, Spur 4: Cla I, Spur 5: Bam HI + Cla I, Spur 6: Ava I + Cla I, Spur 7: Ava I + Bam HI, Spur 8: Bgl II + Bam HI, Spur 9: Bgl II + Cla I, Spur 10: Ava I + Bgl II, Spur 11: Eco RI + Bam HI, Spur 12: Bgl II + Eco RI, Spur 13: Eco RI + Cla I, Spur 14: Ava I + Eco RI, Spur 15: Bam HI, Spur 16: Bgl II, Spur 17: Cla I, Spur 18: Ava I, Spur 19: Eco RI.

Anschließend wurden die analysierten DNA-Fragmente nach dem Verfahren von Southern (s. Abschnitt 2.10.2.) auf Nylonmembranen immobilisiert. Die Restriktionsfragmente, die die 7S K RNA homologe Sequenz beinhalten, wurden durch Hybridisierung mit der durch "Nicktranslation" (s. Abschnitt 2.5.3.) radioaktiv markierten DNA des cDNA-Klones pC/K/III als 7S K RNA spezifische Sonde identifiziert.

Dabei bestätigte sich die schon nach der in vitro Transkription aufgetretene Vermutung, daß die Phagen λ CF1.1 und λ CF9.1 einander sehr ähnlich sind. So unterscheiden sich diese beiden Klone nur dadurch, daß die insertierte, genomische DNA des Phagen λ CF1.1 gegenüber der des Phagen λ CF9.1 um ein terminales, 1.5 Kb-Eco RI-Restriktionsfragment verkürzt ist (nicht abgebildet).

Wie aus dem "Southern-Blot" des Klones λ CF9.1 (Abb. 11/B) resultiert, eignet sich zur weiteren Untersuchung einer genomischen, zur 7S K RNA homologen Sequenz nur ein 1.3 Kb langes Ava I-Restriktionsfragment (Spur 18), das keine weiteren Erkennungssequenzen für die untersuchten Restriktionsenzyme aufweist (Spuren 6, 7, 10 und 14). Daher wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem Restriktionsfragment durchgeführt.

Es erwies sich dabei als vorteilhaft, anstelle des isolierten Fragments einen Subklon zu verwenden, der dieses Fragment beinhaltet. Zur Subklonierung wurde die Phagen-DNA daher mit dem Restriktionsenzym Ava I zerlegt, die DNA-Fragmente in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt, das 1.3 Kb lange Ava I-Fragment eluiert (s. Abschnitt 2.11.3.), die 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Enzym in stumpfe Enden überführt (s. Abschnitt 2.5.2.) und das so behandelte Fragment in die Sma I-Restriktionsschnittstelle des Vektors pUC 8 einkloniert (s. Abschnitt 2.12.). Dieser Subklon mit der zur 7S K RNA homologen Sequenz erhielt die Bezeichnung p7SK/132.

3.4. Charakterisierung des Subklons p7SK/132

3.4.1. Restriktionsanalyse des Subklons p7SK/132

Die weitere Untersuchung des DNA-Fragmentes mit der zur 7S K RNA homologen Sequenz erfolgte über dessen Restriktionsanalyse und den anschließenden Vergleich der ermittelten Restriktionskarte mit der aus der cDNA-Sequenz bekannten Anordnung.

Dazu wurde der Subklon p7SK/132 zunächst mit den Enzymen Acc I, Ava II und Hind III zerlegt und die entstehenden Restriktionsfragmente in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 12/A).

Die anschließende Auswertung der auftretenden Fragmente führte zu der in Abb. 12 dargestellten Restriktionskarte. Dabei zeigte sich, daß die Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme in dem genomischen DNA-Fragment alle auftraten und genau den für ein 7S K RNA Gen erwarteten, aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Abstand voneinander aufwiesen.

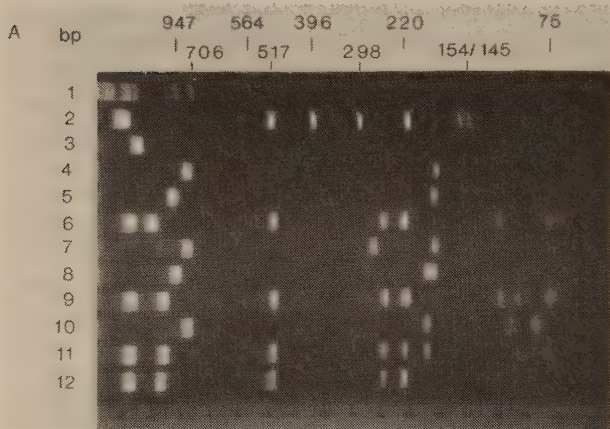
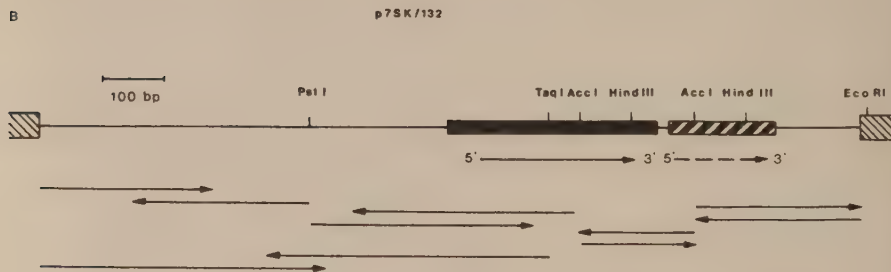


Abb. 12: Anordnung der untersuchten Restriktionsschnittstellen in der klonierten, genomischen DNA des Subklon p7SK/132.

Teil A zeigt die Analyse in einem 1,5%igen Agarosegel, wobei die in den Spuren 6-11 aufgetragenen Ansätze waren neben den angegebenen Enzymen zusätzlich mit Eco RI und restringiert wurden, um die einklonierte DNA von den Vektoranteilen abzutrennen, so daß in den einzelnen Spuren folgende Restriktionen aufgetragen sind: Längenstandard (pAT 153-DNA, mit Eco RI und Hinf I zerlegt, Spur 1), Eco RI + Bam HI (Spur 2), Acc I (Spur 3), Hind III (Spur 4), Ava II (Spur 5), Acc I (Spur 6), Hind III (Spur 7), Ava I (Spur 8), Acc I + Hind III (Spur 9), Hind III + Ava II (Spur 10), Acc I + Ava II (Spur 11).



Teil B zeigt die Restriktionskarte der in dem Subklon p7SK/132 insertierten, genomischen DNA, die 5'-3'-Orientierung (s. Pfeil) des positiven 7S K RNA Gens (schwarzer Balken) und des Pseudogens (schraffierter Balken) sowie die zur Sequenzierung eingesetzte DNA-Fragmente.

Allerdings traten diese Erkennungssequenzen für einige Enzyme dupliziert auf, wobei der Abstand zwischen den verdoppelten Schnittstellen für die Enzyme Acc I und Hind III jeweils 180 bp

betrug. Eine entsprechende Abstandskorrelation bei den ebenfalls duplizierten Ava II-Schnittstellen deutete auf eine Repetition des 3'-terminalen Bereiches ab etwa der ersten Ava II-Erkennungssequenz des putativen 7S K RNA Gens hin (Abb.12/B).

Da die Restriktionskarte des putativen 7S K RNA Gens bezüglich der überprüften Schnittstellen mit der der cDNA übereinstimmte, wurde zunächst die Funktionalität der in diesem Genkandidaten enthaltenen, zur 7S K RNA homologen Sequenz in Form einer weiteren in vitro Transkription überprüft und anschließend das inserierte, genomische DNA-Fragment zur Sequenzierung vorbereitet.

3.4.2. In vitro Transkription des Subklons p7SK/132

Als weiterer Nachweis auf die Integrität der im Subklon p7SK/132 isolierten, genomischen Sequenz für ein menschliches 7S K RNA Gen erfolgte der nochmalige, funktionelle Test auf die Fähigkeit dieser Sequenz, als Matrize für die Transkription authentischer 7S K RNA durch RNA-Polymerase III unter in vitro Bedingungen zu fungieren.

Dazu wurde die kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA dieses Subklons wie in Abschnitt 2.15.2. beschrieben in Gegenwart von 1 µg/ml α -Amanitin und 7 µCi (α - 32 P)-UTP pro Ansatz in vitro mit zellfreiem S-100 Extrakt (s. Abschnitt 2.15.1.) transkribiert.

Die Überprüfung, ob die untersuchte RNA-Spezies tatsächlich zur 7S K RNA homolog ist, erfolgte über ein weiteres Hybridisierungs-Selektions-Experiment (2.10.1.), in dem die putative, neusynthetisierte 7S K RNA eines Ansatzes aus der Vielzahl der in vitro Transkripte an 5 µg filtergebundene 7S K-cDNA hybridisiert (Bed. s. Abschnitt 3.3.2.) und nach Abwaschen der unspezifisch gebundenen Radioaktivität wieder abgeschmolzen wurde. Die unter diesen Bedingungen isolierte, radioaktiv markierte 7S K RNA konnte dann durch die elektrophoretische Auftrennung in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel und anschließende Autoradiographie dieses Gels nachgewiesen werden (s. Abb. 13).

Mit diesem Experiment läßt sich eindeutig nachweisen, daß die in vitro Transkription mit der DNA des Subklons p7SK/132 zu einer RNA führt, die genau die gleiche Länge wie die 7S K RNA aufweist, dabei als ein Hauptprodukt synthetisiert wird (Abb. 13, Spur 2) und die darüber hinaus eine sehr hohe Homologie zu der isolierten 7S K-cDNA aufweisen muß (Abb. 13, Spur 3), da die aus dem Hybridisierungs-Selektions-Experiment wiedergewonnenen Transkripte unter sehr hoher Stringenz (50% Formamid, 55 °C, 5xSSC) an die cDNA hybridisiert wurde.

Desweiteren existieren keine Transkripte, die eine Homologie zur DNA des Blur 8-Klons aufweisen. Dieser Klon besteht aus einer Alu-Sequenz, die in einen pBR 322-Vektor insertiert wurde (57). Dies bedeutet aber im Zusammenhang mit einer, diesmal niedrigeren Hybridisierungsstringenz (50% Formamid, 42 °, 5xSSC), daß der Subklon mit dem putativen 7S K RNA Gen keine in vitro transkribierbare Sequenz besitzt, die der hoch repetitiven Alu-Familie angehört (Spur 4).

Dagegen resultieren einige der Nebentranskripte eindeutig aus der Transkription von pUC 8-Sequenzen (Spur 5).

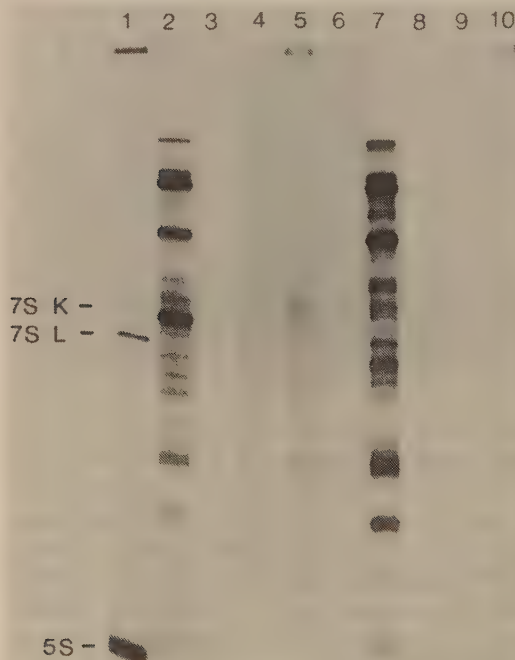


Abb. 13: Analyse der Produkte aus der in vitro Transkription von jeweils 1,2 µg Plasmid-DNA der Subklone p7SK/132 und phK/VI in einem 6Zigen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel. Die Kontrolle der Homologie des untersuchten Transkriptes zur 7S K RNA erfolgte durch "Hybridisierungs-Selektion" (HS) der RNA mit 5 µg isolierter 7S K-cDNA. Der Entstehungsort der übrigen Transkripte wurde durch die analoge "Hybridisierungs-Selektion" (HS) mit jeweils 5 µg linearisierter pUC 8- bzw. pBlur 8-DNA überprüft. Dabei wurden in den Spuren 2-6 die Analysen zum Klon p7SK/132, in den Spuren 7-10 die zum Klon phK/VI aufgetragen. Es bedeuten im einzelnen:
 Spur 1: Längenstandard (in vitro mit 5'-[α-³²P]-3'-Cytidindiphosphat und 7-RNA-Ligase radioaktiv markierte 7S K- und L-RNA sowie 5S RNA - s.Abschnitt 2.3.2.), Spur 2: p7SK/132-Transkription-1 µg/µl α-Amanitin, Spur 3: HS mit 7SK-cDNA, Spur 4: HS mit pBlur 8-DNA, Spur 5: HS mit pUC 8-DNA, Spur 6: keine Probe, Spur 7: phK/VI - 1 µg/µl α-Amanitin, Spur 8: HS mit isolierter 7SK-cDNA, Spur 9: HS mit pBlur 8-DNA, Spur 10: HS mit pUC 8-DNA. Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Der Vergleich der in vitro synthetisierten RNAs dieses Subklons mit denen des Subklons phK/VI (Abb.13, Spur 7) zeigt allerdings, daß die drei übrigen Haupttranskripte des Plasmids p7SK/132 offensichtlich dort ebenfalls auftauchen und sogar noch verstärkt synthetisiert werden, während ein 7S K RNA homologes Transkript dort nicht nachzuweisen ist (Spuren 7 und 8). Dabei wurde der fehlende Nachweis dieser Haupttranskripte in den zugehörigen Hybridisierungs-Selektions-Experimenten (Spuren 5 und 10) darauf zurückgeführt, daß diese RNAs möglicherweise infolge ihrer Größe und der damit verbundenen DNA-RNA-Hybridstär-

ke nicht mehr von der filtergebundenen pUC 8-DNA abgeschmolzen werden konnte.

Um nachzuweisen, daß die in vitro synthetisierte, putative 7S K RNA in der gleichen Konformation vorliegt, wie die in vivo synthetisierte RNA, wurde die gelelektrophoretische Auftrennung der Syntheseprodukte auf einem nicht denaturierenden, 6-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel durchgeführt.

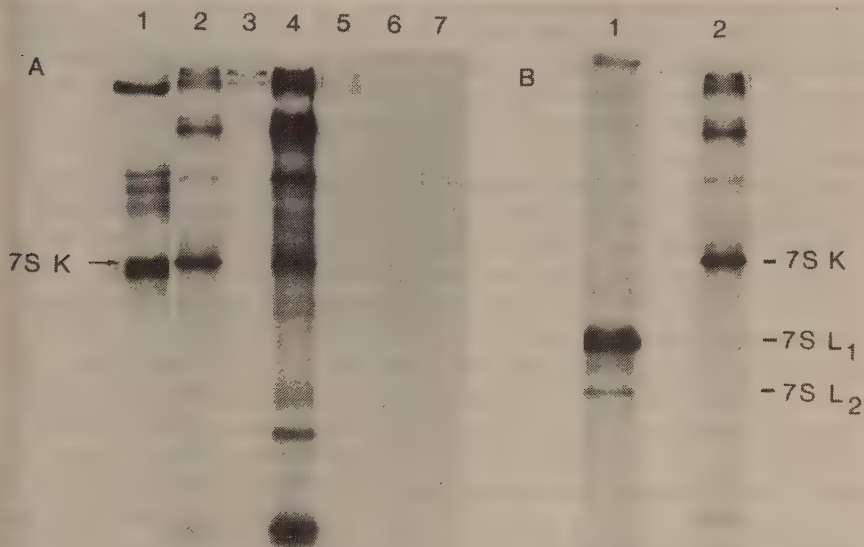


Abb. 14: Analyse der in vitro Transkriptionsprodukte der Plasmide p7SK/132 und pHK/VI auf einem nicht denaturierenden 6-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel. Dabei erfolgte die Synthese in Gegenwart von normalen (1 µg/ml) und hohen (200 µg/ml) α-Amanitin-Konzentrationen. In den jeweiligen Spuren wurden folgende Proben aufgetragen: Spur 1: Längenstandard (in vitro Transkription eines λ-Phagen, der ein Transkript in der Größe der 7S K RNA aufweist), Spur 2: Transkripte des Klon p7SK/132 bei 1 µg/ml Amanitin, Spur 3: Transkripte des Klon p7SK/132 bei 200 µg/ml Amanitin, Spur 4: Transkripte des Klon pHK/VI bei 1 µg/ml Amanitin, Spur 5: Transkripte des Klon pHK/VI bei 200 µg/ml Amanitin, Spur 6: HS der Transkripte des Klon p7SK/132 mit der DNA des 7S K-cDNA-Klon pck/III, Spur 7: HS der Transkripte des Klon pHK/VI mit der DNA des 7S K-cDNA-Klon pck/III.
 HS: Abk. f. "Hybridisierungs-Selektion". Die Menge an filtergebundener DNA betrug 5 µg. Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie. In Teil B ist der Vergleich der Transkriptionsraten des putativen 7S L Gens (Spur 1) mit der des 7S K Gens (Spur 2) dargestellt. Für den Vergleich erfolgte die Transkription wie im Text beschrieben in Gegenwart von 1 µg/ml α-Amanitin. Die Syntheseprodukte wurden in einem 6-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt. Expositionszeit: 8 Stunden, ohne Verstärkerfolie.

Der Nachweis, daß bei gleicher Größe von in vitro und in vivo Transkriptionsprodukt auch die gleiche Konformation vorliegt und darüber hinaus die in vitro synthetisierte RNA aufgrund von Hybridisierungen homolog zur 7S K-cDNA ist, würde die These erhärten, daß die isolierte genomische Sequenz ein 7S K Gen enthält (Abb. 14/A).

Die Kontrolle, ob die analysierten Transkripte von RNA-Polymerase III synthetisiert wurden, erfolgte durch den Vergleich der Transkription der Matrizen-DNA in Gegenwart von 1 µg/ml und 200 µg/ml α -Amanitin (Abb. 14).

Schließlich kann auch der Vergleich der Transkriptionsrate des putativen 7S K RNA Gens mit der eines bekannten RNA-Polymerase III-Gens einen weiteren Hinweis auf die Authentizität des putativen 7S K Gens geben (Abb. 14/B). Hierfür erfolgte die Transkription mit je 1.3 µg kovalent geschlossener, zirkulärer Plasmid-DNA, wie in Abschnitt 2.15.2. beschrieben, in Gegenwart der jeweiligen Mg^{++} -Optimumkonzentrationen (5 mM für das putative 7S K Gen, s. Abschnitt 3.5.1.; 1.8 mM für das 7S L Gen; s. 68 , 132).

Auch aus Abb. 14 geht hervor, daß die untersuchte RNA-Spezies (s. Pfeil) die gleiche Größe wie die 7S K RNA aufweist (Spuren 2 und 6). Darüber hinaus wird die Synthese dieser RNA in Gegenwart hoher α -Amanitin-Konzentrationen (Spur 3) inhibiert, so daß das untersuchte Produkt erwartungsgemäß von RNA-Polymerase III transkribiert wird.

Ferner entsprechen die Transkriptionsergebnisse für den Klon pHK/VI in diesem Gelsystem denen in dem denaturierenden 8M Harnstoffgel. Allerdings zeigt sich dabei, daß dieses Gelsystem nicht so eindeutige Aussagen über die Identität eines analysierten Transkriptes liefert, da ein Nebentranskript, das keine Homologie zur 7S K-cDNA aufweist (Spur 7), die gleichen Laufeigenschaften besitzt wie die 7S K RNA.

Auch der Vergleich der Syntheserate der putativen 7S K RNA mit der der 7S L RNA (Abb. 14/B) deutet darauf hin, daß diese hier im Subklon p7SK/132 vorliegende, zur 7S K RNA homologe, genomische Sequenz über einen ähnlich effizienten Promotor verfügt wie die des 7S L RNA Gens. Allerdings beträgt die Transkriptionsrate des putativen 7S K Gens etwa nur 1/3 von der des 7S L Gens (Abb. 14/B). Dieses Verhältnis der Syntheseraten resultiert möglicherweise daraus, daß das putative 7S K RNA Gen in den pUC 8-Vektor, das 7S L RNA Gen aber in den pAT 153 Vektor inkloniert wurde und der pUC 8-Vektor mehr um RNA-Polymerase III-Transkriptionsfaktoren kompetiert als der pAT 153-Vektor. Für diese Annahme spricht auch die höhere Zahl an Vektortranskripten bei der Transkription mit dem pUC 8-Vektorsystem (Abb. 14/B). Insgesamt weisen diese in vitro Transkriptionsergebnisse darauf hin, daß der Klon p7SK/132 die Gensequenz für das 7S K RNA Gen tragen muß, da das betrachtete Transkript, daß von RNA-Polymerase III synthetisiert wird, sowohl in der Größe als auch in der entsprechenden Konformation mit der 7S K RNA übereinstimmt.

Darüber hinaus besteht eine sehr hohe Homologie zur 7S K-cDNA. Schließlich sind auch Transkriptionsraten dieses putativen 7S K Gens und des 7S L Gens miteinander vergleichbar.

3.4.3. Sequenzanalyse des Plasmidsubklons p7SK/132

Die Sequenzierung der in den Subklon p7SK/132 einklonierten, genomischen DNA erfolgte nach der Methode von Sanger und Nicholson (124), wie in Abschnitt 2.14 beschrieben. Dazu wurde die insertierte DNA mit den Enzymen Eco RI und Bam HI aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten und anschließend entweder nur mit Acc I oder mit Acc I und Pst I oder mit Taq I in kleinere Subfragmente zerlegt. Diese Subfragmente konnten dann auf einem 1.3%igen Agarosegel aufgetrennt, nach der Methode von Tautz et al. eluiert (s. Abschnitt 2.11.3) und in die entsprechend vorbereiteten M13 mp 18 bzw. mp 19-Vektoren einkloniert (s. Abschnitte 2.12.4 und 2.13) werden. Die zugehörige Sequenzierungsstrategie entspricht der, die in Abb. 12/B dargestellt wurde.

Der Vergleich der analysierten Sequenz mit der bekannten cDNA-Sequenz zeigt, daß die der 7S K RNA entsprechende DNA-Sequenz

```
p7SK/132  GGATCCCCC  GAGGGACGAT  CCGAGCCCAC  CTTCCACCAA  TGCATTCAGA
          CTCGCAGAA  GGGGTTTAAA  AAAAAATACG  CACACTGAGC  CAAGAAGGAC
          CCCAGCTCCA  GCCAAGGGGC  CACTCTGCCA  GACTGGATGG  AGCAGGAGGA
          CTAAAGGACA  AGAGGAAGAA  AAGACAAGAG  AAGGACTGAA  CTGGGGAGTG
          AGGGAAGAAT  GCGAGAGTGA  GACTCAGAGA  GTAAAGGGGA  GGGAAAAAAA
          AGAAGAGAGA  AAGGGCGAGG  AAGGGGGCGA  CCGCAGTGAGG  GAGACTAGAC
          CTGGAGTCCA  TCGGAGGCCT  GGAGCCGCAT  CTAAAGCGCC  AGGTCAGCGG
          TCCCGGCTGG  TGAGACCAGC  AGCGCTCTAA  CGCGGGAGCT  GGGCCAGGCT
          CCGGGACGCG  CCTCNCCAAT  GGAGACTGCA  GTATTTAGCA  TGCCCCACCC
          ATCTGCAAGT  GCATTCTGGA  TAGTGTCAAA  ACAGGCGGAA  ATCAAGTCCG
          TTTATCTCAA  ACTTTAGCAT  TTTGGGAATA  AATGATATTT  GCTATGCTGG
          TTAAATTAGA  TTTTAGTTAA  ATTCCTGCT  GAAGCTCTAG  TACCATAAGC
```

	AACTTGACCT	AAGTGTAAG	TTGAGATTC	CTTCAGGTTT	ATATAGCTTG
p7SK/132	TGCGCCGCCT	GGGTACCTCG	GATGTGAGGG	CGATCTGGCT	GCGACATCTG
		5' - *	*****	*****	*****
7SK/N.H.Z.					
	TCACCCCAT	GATCGCCAGG	GTTGATTCGG	CTGATCTGGC	TGGCTAGGCG
	*****	*****	*****	*****	*****
					
	GTGTCCCCT	CCTCCCTCAC	CGCTCCATGT	GCGTCCCTCC	CGAAGCTGCG
	*****	*****	*****	*****	*****
C.....					
	CGCTCGGTCG	AAGAGGACGA	CCATCCCCGA	TAGAGGAGGA	CCGGTCTTCG
	*****	*****	*****	*****	*****
			..T.....	A.....	
	GTCAAGGGTA	TACGAGTAGC	TGCGCTCCCC	TGCTAGAACC	TCCAAACAAG
	*****	*****	*****	*****	*****
					
	CTCTCAAGGT	CCATTTGTAG	GAGAACGTAG	GGTAGTCAAG	CTTCCAAGAC
	*****	*****	*****	*****	*****
					
	TCCAGACACA	TCCAAATGAG	GCGCTGCATG	TGGCAGTCTG	CCTTTCTTTT
	*****	*****	*****	*****	*****
					
	<u>GACCCATTAC</u>	<u>CCATCTAAGG</u>	<u>ACCGGTCTTC</u>	<u>GGTCAAGGGT</u>	<u>ATACGAGTAG</u>
					
	CTGCGCTCCC	CTGCTAGAAC	CTCCAAACAA	GCTCTCAAGG	TCCATTTGTA
					
	GGAGAACGTA	GGGTAGTCAA	GCTTCCAAGA	CTCCAGACAC	ATCCAAATGA
					
	GGCGCTGCAT	GTGGCAGTCT	GCCTTTCTTT	<u>TGACCCATTA</u>	<u>CCCATCTAAG</u>
					3'
	TTAGATGCTT	TTTTAAAGTT	TTTTTTAATT	TTAAATTTTT	AATTTTTTTT
	ATTTAATTTA	TTTTTTATTT	TTTGAGTCGG	ATCTCGCCTG	ACTGTAACCT
	CCACCTCCCG	GGGAATTC			

Abb. 15: Gesamtsequenz der im Subklon p7SK/132 insertierten, genomischen DNA. Die Sequenz des 7S K RNA Gens ist durch die Sterne, das anschließende Pseudogen durch die Quadrate und die "direct repeats" durch die Striche in der nächsten Zeile unter dem jeweiligen Sequenzabschnitt gekennzeichnet. In der Zeile darunter sind durch Punkte die zur Sequenz der 7S K RNA aus Novikoff Hepatoma Zellen (7SK/N.H.Z.) homologen Basen dargestellt. Dabei wurden Deletionen durch einen Strich (-) hervorgehoben.

(7S K-DNA) bei der Position + 669, vom ersten Basenpaar der Bam HI-Erkennungssequenz an gerechnet, beginnt und bis zur Position +1000 reicht und somit genauso lang wie die RNA-Sequenz ist.

Dabei ist diese Sequenz zu 100% mit der der cDNA für die 7S K RNA aus HeLa S₂-Zellen identisch (s. Abb. 15); sie zeigt aber einige Basenaustausche gegenüber der Sequenz für die entsprechende RNA aus Novikoff-Hepatoma Zellen, die einem Rattengewebe entstammen (45). Bemerkenswert ist aber, daß die Länge der K-RNA aus HeLa S₂-Zellen trotz der divergenten Sequenz mit der aus Rattenzellen übereinstimmt.

Dieses Ergebnis belegt im Zusammenhang mit den, aus der Phagen- und der Plasmid-DNA gewonnenen Transkriptionsdaten, daß diese genomische Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit ein 7S K RNA-Gen darstellt.

Die weitere Analyse der ermittelten Sequenz bestätigte die auf der Restriktionskarte für diesen Klon beruhende Vermutung, daß, bezogen auf das erste Basenpaar des Gens, die 3'-terminale Gensequenz von der Position +169 an dupliziert vorliegt.

Diese 179 bp lange Repetition wird auf beiden Seiten von einer direkten, 17 bp langen Sequenzwiederholung, sog. "direct repeats" (in Abb. 15 unterstrichene Sequenz) flankiert. Weiterhin zeigt diese Duplikation keinen Basenaustausch, so daß diese Sequenz mit der entsprechenden im Gen identisch ist. Dieser hohe Konservierungsgrad sowohl in den "direct repeats" als auch in der 3'-terminalen Genduplikation deutet entweder darauf hin, daß diese Duplikation erst vor einem relativ kurzen Zeitraum erfolgte und daher noch keine Mutationen in der duplizierten Region auftreten konnten oder daß diese Struktur physiologisch in einer bisher ungeklärten Form besondere Relevanz erlangt.

Infolge der, für mobile DNA-Elemente spezifischen "direct repeats" ist jedes Basenpaar des Gens von der Position +169 an nach exakt 179 bp wiederholt. Der Vergleich mit dem Abstand von Gen und allerdings 3'-verkürztem Pseudogen in der 5S RNA Transkriptionseinheit aus *Xenopus laevis* zeigt, daß infolge des 60 bp-Abstands des 5S-Gens vom Pseudogen dort die wiederholten Basen 181 bp voneinander entfernt liegen (158).

Dieser Wert von 179 bzw. 181 bp ist mit den jeweiligen Spezies-spezifischen Abweichungen identisch mit der Länge der DNA, die durch ein mit dem Histon H₁ vervollständigtes Nukleosom vor einem nukleolytischen Abbau mit DNase I geschützt ist.

Diese Übereinstimmung basiert möglicherweise nicht auf einem Zufall, so daß sie eventuell einen Hinweis auf den Entstehungsmechanismus dieser beiden ihr jeweiligen Gen flankierenden Pseudogene beinhaltet. In diesem Zusammenhang erscheint erwähnenswert, daß eine Wechselwirkung des Histons H₁ mit dem 5S RNA Gen möglicherweise dessen Transkription verhindert (163).

3.4.4. "Fingerprint"-Analyse des in vitro Transkriptes aus dem Klon p7SK/132

Der Beweis, daß das zur 7S K-cDNA hochhomologe in vitro Transkript mit der in vivo gebildeten 7S K RNA identisch ist, erfolgte durch den Vergleich der T₁-Fingerprints der radioaktiv, mit ³²P markierten in vivo und in vitro synthetisierten Produkte. Derartige Fingerprints beruhen auf der Spaltung einer RNA mit der Ribonuklease T₁, die die Phosphodiesterbindung vor der 5'-Phosphatgruppe des auf eine Guanidingruppe folgenden Ribonukleotids spaltet. Dadurch entstehen aus jedem RNA Molekül charakteristische Oligonukleotide, die aufgrund ihrer Größe und ihrer Zusammensetzung nach der zweidimensionalen Auftrennung zu ganz charakteristischen Spaltmustern führen. Daher läßt sich die Identität zweier RNAs durch den Vergleich der Oligonukleotidmuster eindeutig feststellen.

Die hier eingesetzte Methode entsprach dem von Gross et al. (128) beschriebenen Verfahren. Dabei wurden die radioaktiv markierten K-RNAs, wie in Abschnitt 2.16.1. beschrieben, isoliert, wobei bei der in vitro Synthese der 7S K RNA für ausreichende Mengen 16 Transkriptionsansätze (s. Abschnitt 2.15.2) benötigt wurden, entsprechend etwa 50000 cpm an radioaktiv markierter 7S K RNA für jeden T₁-Fingerprint.

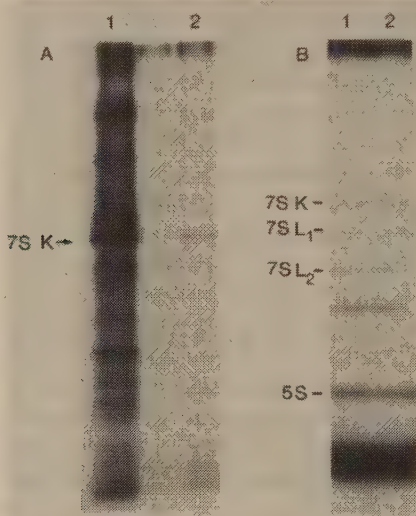


Abb. 16. Reinheitsanalyse der radioaktiv markierten RNAs für die T₁-Fingerprints. Die radioaktiv markierten RNAs wurden zur Analyse auf ein 6-15%iges SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetragen. Es gilt dabei im einzelnen: Teil A: in vitro Transkriptionsprodukte des Klons p7SK/132 mit kovalent geschlossenem, zirkulärem Plasmid (Spur 1) und bei Verwendung des isolierten, genomischen DNA-Fragmentes (Spur 2). Teil B: in vivo Transkriptionsprodukte aus der Zytoskelettfraktion (Spur 1 und 2). Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Von entscheidender Bedeutung für die Qualität einer Oligonukleotid-Analyse ist dabei der Reinheitsgrad der eingesetzten RNA. Für die Isolierung der in vivo markierten 7S K RNA konnten

die zytoplasmatischen RNAs aus der Zytoskelettfraktion über ein 6-15%iges SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt und die K-RNA daraus direkt isoliert werden (Abb. 16/B).

Die Isolierung hochreiner in vitro markierter 7S K RNA war dagegen nur durch die Verwendung der genomischen Fragment-DNA (Abb. 16/A, Spur 2) bei der Transkription mit zellfreiem Extrakt möglich.

Aus Abb. 16 ist eindeutig zu entnehmen, daß die in vitro Transkription mit 0.5 pmol Fragment-DNA zu erheblich geringeren Syntheseraten führt, obwohl die Promotor-Konzentration im Vergleich zur Transkription mit kovalent geschlossener, zirkulärer Plasmid-DNA (ebenfalls 0.5 pmol) konstant gehalten wurde (Spur 2). Dieser Effekt konnte aber dadurch ausgeglichen werden, daß, in absoluten Mengen, genauso viel Fragment-DNA eingesetzt wurde wie Plasmid-DNA (Daten nicht gezeigt). Trotzdem mußten für die Synthese ausreichender Mengen an in vitro Transkriptionsprodukt 16 Ansätze eingesetzt werden.

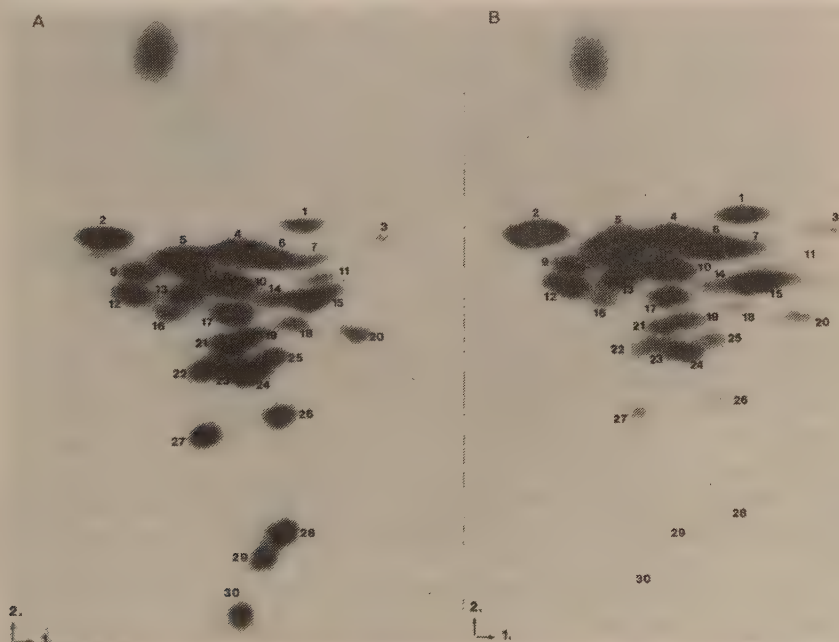


Abb. 17: "T₁-Fingerprint"-Analyse menschlicher 7S K RNA. Teil A zeigt dabei den aus der in vivo, mit ³²P-Orthophosphat markierten 7S K RNA. Teil B zeigt den "Fingerprint" aus der in vitro, mit isolierter, genomischer Fragment in Gegenwart von α-³²P-UTP und α-³²P-GTP synthetisierten RNA. Die gereinigten RNAs wurden, wie in Abschnitt 2.16.1. beschrieben, mit RNase T₁ inkubiert und die Oligonukleotide auf Zellulose-Azetat-Streifen in der ersten Dimension (horizontaler Pfeil, Abschnitt 2.16.2) aufgetrennt. In der zweiten Dimension (vertikaler Pfeil) erfolgte die Homochromatographie auf DEAE-Zellulose-Dünnschicht-Platten (s. Abschnitt 2.16.3.). Expositionszeit: 152 Stunden.

Die radioaktive Markierung des in vitro Transkripts in Gegenwart von sowohl (α - 32 P)-UTP als auch (α - 32 P)-GTP erfolgte zur Mehrfach-Markierung der verschiedenen, entstehenden Oligonukleotide. Dadurch konnte die Verteilung der radioaktiv markierten Phosphoratome der angenähert werden, die bei der in vivo Markierung der 7S K-RNA auftritt. (α - 32 P)-GTP wurde eingesetzt, um alle Oligonukleotide radioaktiv zu markieren.

Der Vergleich der "T₁-Fingerprints" von in vivo und in vitro synthetisierter RNA zeigt eindeutig (Abb. 17), daß die in beiden Analysen verwendeten RNAs miteinander identisch sein müssen, da mit dem in vivo Produkt (A) das gleiche Oligonukleotidmuster erhalten wird wie mit dem in vitro Produkt (B). Allerdings unterscheiden sich die Signalintensitäten einiger Oligonukleotide in den beiden Analysen. Diese Unterschiede können im wesentlichen darauf zurückgeführt werden, daß die Verfahren zur radioaktiven Markierung der beiden RNAs verschieden sind.

Dieses Ergebnis bestätigte die, aus den Hybridisierungs-Selektions-Experimenten (s. Abschnitt 3.4.2.) abgeleitete Identität zwischen dem analysierten in vitro Transkriptionsprodukt und der in vivo synthetisierten 7S K RNA. In Verbindung mit den erhaltenen Sequenzdaten über das genomische DNA-Fragment des analysierten Subklons p7SK/132 resultiert aus diesem Ergebnis, daß die mit der 7S K RNA identische DNA-Sequenz dieses Subklons das menschliche Gen für diese RNA darstellt.

3.5. Einfluß verschiedener Parameter auf die Transkription des 7S K RNA Gens

3.5.1. Abhängigkeit der Transkription des 7S K RNA Gens von der Mg²⁺-Konzentration

Die Versuchsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen (68, 125) haben gezeigt, daß auch bei der Transkription von RNA-Polymerase III Genen genspezifische Mg²⁺-Ionenkonzentrationen existieren, bei denen das jeweilige Genprodukt bevorzugt synthetisiert wird.

Daher wurden mehrere Transkriptionen, wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben, durchgeführt und dabei die Mg²⁺-Konzentration im Reaktionsansatz variiert. Daran schloß sich die Analyse der Produkte in einem denaturierenden, 6%igen Polyacrylamid-8M Harnstoffgel an. Die unter den jeweiligen Bedingungen gebildete Gesamtmenge an 7S K RNA konnte infolge der auftretenden Nebentranskripte nur dadurch relativ einfach bestimmt werden, daß die Signalintensität auf dem Röntgenfilm mit Hilfe eines Mikro-Densitometers gemessen

wurde. Das Mg^{2+} -Optimum ließ sich dann aus den relativen Signalstärken in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration ableiten. Die Ergebnisse aus dieser Analyse belegen (Abb. 18, mit 7S K gekennzeichnetes Transkript), daß die 7S K RNA Transkription bevorzugt unter den Standardbedingungen, d. h. bei 3-5 mM Mg^{2+} (Spuren 2 und 3), erfolgt, obwohl die Synthese über einen weiten Bereich (1.8 mM bis 6.8 mM) signifikante Transkriptmengen liefert. Der "Nullwert" von 1.8 mM Mg^{2+} ergab sich aus der im Zellextrakt enthaltenen Ionenmenge, die nur durch eine Dialyse hätte entfernt werden können. Die in diesem Experiment erhaltenen, unzweideutigen Daten rechtfertigen aber den Verzicht auf diese Korrektur des Nullwertes.

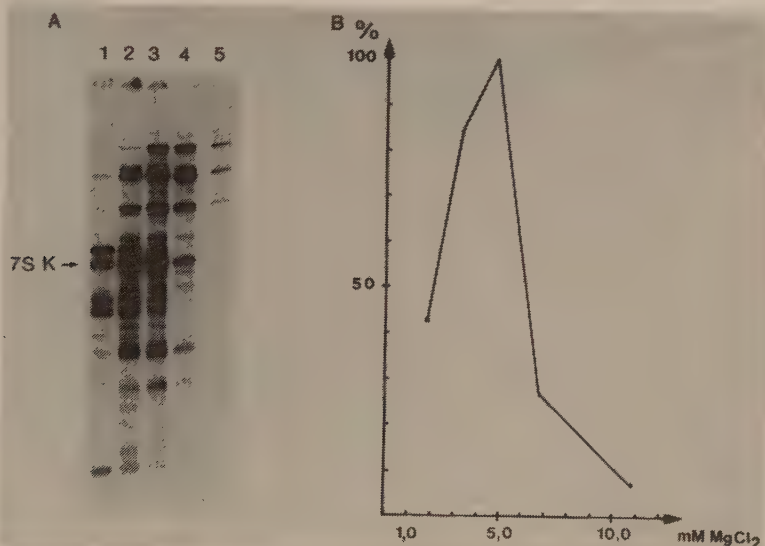


Abb. 18: Mg^{2+} -Kinetik für die Transkription des 7S K RNA Gens. Die Transkription erfolgte mit 1.3 μ g DNA des Kions p7SK/132, wie in Abschnitt 2.15.2. beschrieben, mit 7 pCi (α - 32 P)-UTP (spez. AKT. 500 Ci/ μ mol) pro Ansatz. Teil A zeigt die Auftrennung der Syntheseprodukte in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-3M Harnstoffgel. Die Ionenkonzentrationen waren: 1.8 mM (Spur 1), 3.3 mM (Spur 2), 4.6 mM (Spur 3), 6.8 mM (Spur 4) und 10.8 mM (Spur 5). Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie. In Teil B sind die relativen Signalintensitäten der 7S K RNA als Funktion der Mg^{2+} -Konzentration aufgetragen.

Ein Vergleich mit den Optimum-Werten anderer RNA-Polymerase III-Gene zeigt, daß das K-Transkriptionsoptimum zwar nicht so deutlich von dem anderer Gene verschieden ist wie z.B. das der 7S L-Transkription, trotzdem läßt sich ein genspezifisches Optimum nachweisen. So verläuft mit S-100 Extrakt aus HeLa S_{α} -Zellen die Transkription des 5S RNA Gens (Xenopus 1., 125) bevorzugt bei

2-4 mM (Maximum: 2.5 mM), die der Ad 2 VAI/II Gene (125) bei 5-7 mM (Maximum: 7 mM), die des tRNA^{Arg}-Gens (Drosophila m., 133) bei 3 mM und die des 7S L RNA Gens (HeLa, 68) bei 1.5 mM MgCl₂, während gereinigte RNA-Polymerase III über den gesamten Bereich von 4-16 mM (134) MgCl₂ relativ gleich aktiv bleibt. Neben diesen quantitativen Effekten für die Transkription des 7S K RNA Gens ist auch eine qualitative Änderung hinsichtlich des Spektrums der neusynthetisierten RNAs bei zunehmender MgCl₂-Konzentration festzustellen. Es handelt sich dabei um das Transkript, das etwas größer als die 7S K RNA ist und das erst bei MgCl₂-Konzentrationen über 7 mM nicht mehr synthetisiert wird. Diese RNA resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Transkription von Vektor-DNA, wie das Hybridisierungs-Selektions-Experiment aus Abschnitt 3.4.2 zeigt, da die dort verwendete Mg²⁺-Konzentration der in Spur 3 in Abb. 18 entsprach.

3.5.2. Abhängigkeit der in vitro Transkription der 7S K RNA von der K⁺-Konzentration

Die in vitro Transkription mit RNA-Polymerase III wird nicht nur durch die Mg²⁺-Ionen-Konzentration, sondern auch durch die der K⁺- bzw. NH₄⁺-Ionen beeinflusst (125), wobei genspezifische Salz-optima im Vergleich zu dem Mg²⁺ weniger stark ausgeprägt auftreten. Dieser Effekt beruht darauf, daß z.B. das K⁺-Ionenoptimum für die in vitro Transkription von Kalbsthymus-DNA mit gereinigter RNA-Polymerase III bei einem Wert von 60 mM liegt (135). Zur Bestimmung der Abhängigkeit der 7S K RNA Transkription von der K⁺-Ionenkonzentration ließ sich das in Abschnitt 3.5.1. beschriebene Verfahren anwenden. Allerdings wurde statt der Mg²⁺-Ionenkonzentration die der K⁺-Ionen variiert, so daß die Transkription bei 5 mM MgCl₂ erfolgte.

Aus dieser Analyse (Abb. 19) geht hervor, daß die 7S K RNA bevorzugt bei K⁺ Konzentrationen zwischen 70 und 90 mM mit einem wahrscheinlichen Maximum bei 80 mM KCl synthetisiert wird (Spuren 2-4). Ein Vergleich mit den Optimumwerten anderer Gene belegt den erwarteten Effekt der wenig ausgeprägten Genspezifität dieses Parameters. So erfolgt bei Verwendung von S-100 Extrakt aus HeLa S₃-Zellen die in vitro Transkription von 5S RNA-Genen (Xenopus l., 125) bei 60-80 mM (Maximum: 70 mM), die von Ad 2 VAI/II-Genen (125) bei 60-100 mM (Maximum: 100 mM), die des tRNA^{Arg}-Gens (Drosophila m., 133) bei 120 mM und die des 7S L RNA Gens (HeLa, 68) bei ebenfalls 80 mM.

Darüber hinaus zeigen sich auch, wie schon in der MgCl₂-Kinetik qualitative Änderungen im Spektrum der neusynthetisierten RNAs

in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration. Es handelt sich dabei um das Transkript, das geringfügig größer als die 7S K RNA ist und das bei KCl-Konzentrationen über 80 mM verschwindet. Möglicherweise stimmt es mit dem überein, das bei niedrigen $MgCl_2$ -Konzentrationen auftritt (s. Abschnitt 3.5.1.), da es die gleichen Laufeigenschaften aufweist wie die dort auftretende RNA. Sehr wahrscheinlich ist es auf die Transkription von Vektor-Sequenzen zurückzuführen, da das Hybridisierungs-Selektions-Experiment in Abschnitt 3.4.3. bei einer Konzentration von 70 mM KCl durchgeführt wurde und eine gleich große RNA nur mit dem pUC 8-Vektor hybridisierte.

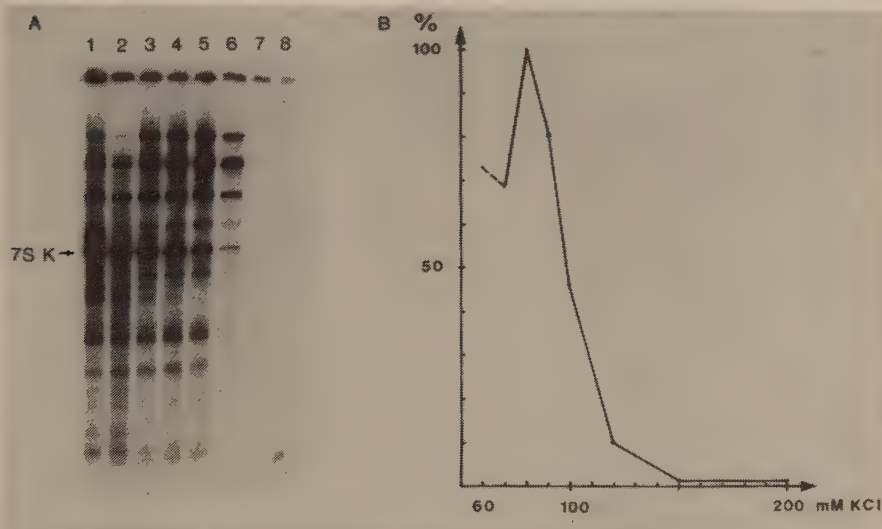


Abb. 19: K^+ -Kinetik für die *in vitro* Transkription des 7S K RNA Gens. Die Transkription erfolgte mit 1.8 μ g DNA des Klon p7SK/132. Teil A zeigt die Auftrennung der Syntheseprodukte in einem 20%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel. Die verschiedenen K^+ -Konzentrationen waren: 60 mM (Spur 1), 70 mM (Spur 2), 80 mM (Spur 3), 90 mM (Spur 4), 100 mM (Spur 5), 120 mM (Spur 6), 150 mM (Spur 7), 200 mM (Spur 8). Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie. In Teil B wurden die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration aufgetragen.

3.5.3. Einfluß weiterer Faktoren auf die Transkription mit einem S 100-Extrakt am Beispiel des 7S K RNA Gens

Andere Parameter, die die *in vitro* Syntheserate einer RNA beeinflussen können, sind die Menge an eingesetzter DNA und die Temperatur, bei denen die Transkription stattfindet.

Obwohl diese Faktoren primär den verwendeten Extrakt sowie den gesamten Transkriptionsapparat betreffen, geben sie innerhalb

dieser Einschränkungen einigen Aufschluß über die ungefähre Größenordnung der Bindungskonstanten für die Assoziation von Transkriptionsfaktoren mit dem jeweilig eingesetzten Gen.

a) Einfluß der DNA-Menge auf die in vitro Transkription der 7S K RNA

Zur Untersuchung auf das extraktspezifische DNA-Optimum der Transkription mit RNA-Polymerase III in Gegenwart des 7S K RNA Gens erfolgte die Transkription der Plasmid-DNA des Subklons p7SK/132, wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben, wobei die eingesetzte DNA-Menge variiert wurde. Die weitere Analyse verlief wie in Abschnitt 3.5.1. beschrieben.

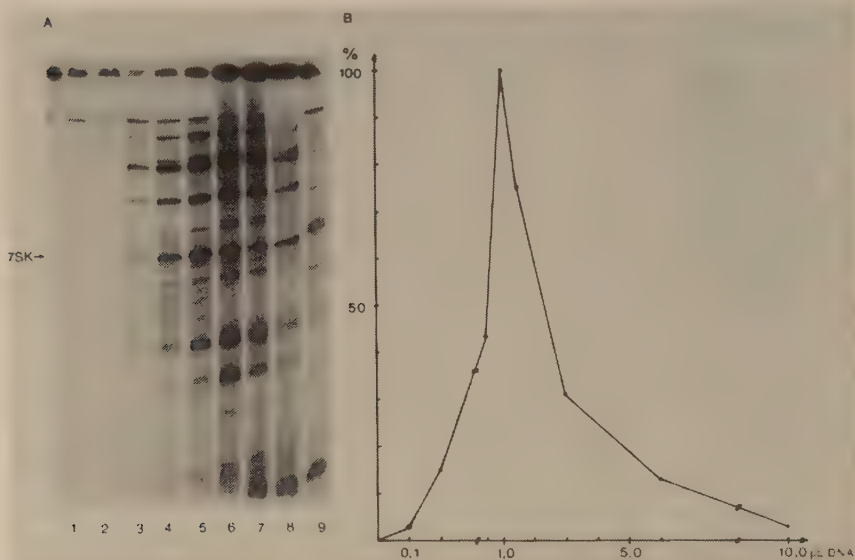


Abb. 20: Bestimmung des DNA-Optimums für die Transkription des 7S K RNA Gens mit dem S 100-Extrakt nach Weil et al. (125). Die Transkription erfolgte wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben mit 7 pCi (α - 32 P)-UTP pro Ansatz. Teil A zeigt die Auftrennung der Syntheseprodukte in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgele. Die dabei pro 50 µl Ansatz verwendeten Mengen an DNA des Subklons p7SK/132 waren: 0 µg (Spur 1), 0.1 µg (Spur 2), 0.25 µg (Spur 3), 0.5 µg (Spur 4), 1.0 µg (Spur 5), 1.5 µg (Spur 6), 3.0 µg (Spur 7), 5.0 µg (Spur 8) und 10 µg (Spur 9). Expositionszeit: 8 Stunden ohne Verstärkerfolie. In Teil B wurde die relative Signalintensität in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration aufgetragen.

Diese Analyse (Abb. 20) zeigt, daß die Transkription des 7S K RNA Gens bevorzugt bei einer Gesamt-DNA-Menge von 30-60 µg/ml (Spuren 5 und 6) stattfindet. Ein direkter Vergleich mit den Werten für die 5S- oder VAI-Gen Transkription (125) ist nicht möglich, da der von Weil et al. verwendete Extrakt aus KB-Zellen

isoliert wurde und andere Extraktmengen für die DNA-Mengenkinetik verwendet wurden.

Berücksichtigt man aber, daß die Proteinkonzentration in beiden Extrakten nahezu übereinstimmt (15 mg/ml bei dem Extrakt aus HeLa-Zellen und 12 mg/ml bei dem Extrakt aus KB-Zellen) und nimmt man weiterhin an, daß dementsprechend auch die Konzentration aller Transkriptionsfaktoren des RNA-Polymerase III-Systems nahezu übereinstimmen, so sollte das DNA-Optimum nur von eingesetzten Extraktmenge abhängen. Da in diesen Experimenten eine viermal so hohe Extraktkonzentration wie bei den Weil'schen Analysen eingesetzt wurde, folgt daraus, daß auch das DNA-Optimum um den Faktor 4 höher liegt. Diese Abschätzung ist insofern gerechtfertigt, als daß die eingesetzte DNA nicht nur Transkriptionsfaktoren bindet, sondern sie fungiert auch als unspezifisch proteinbindendes Molekül mit dann geringeren Transkriptionsraten. Unter diesen Voraussetzungen werden die erhaltenen Werte vergleichbar mit den von Weil et al. (125) angegebenen Konzentrationen von 40 µg/ml für die 5S RNA-Transkription und 45-112 µg/ml für die VAI-Transkription. Berücksichtigt man die eingesetzten Proteinkonzentrationen, so müßte das DNA-Optimum bei der Transkription des 7S K RNA Gens einen Wert von etwa 7 bis 15 µg/ml aufweisen. Dies könnte aber bedeuten, daß die Gesamtbindungskonstante für die Assoziation aller notwendigen Transkriptionsfaktoren an das 7S K-Gen beträchtlich höher liegen muß als die aus den beiden anderen Genen, wobei diese Fragestellung natürlich erst mit aufgereinigten Transkriptionsfaktoren, also in einem rekonstituierten System, eindeutiger beantwortet werden kann.

b) Einfluß der Temperatur auf die Transkription des 7S K RNA Gens mit einem S 100-Extrakt.

Einen weiteren Faktor, der die Syntheserate der RNA beeinflusst, bildet die Temperatur. Dieser Parameter erfaßt allerdings neben der Gesamtheit aller Transkriptionsfaktoren eher die degradierenden Aktivitäten in dem benutzten Extrakt. Derartige Aktivitäten können entweder durch Proteolyse der RNA-Polymerasesysteme oder durch Nukleasewirkung zur Reduktion der RNA-Syntheserate führen.

Um aber derartige Einflüsse zu minimieren und um die mit dem 7S K RNA Gen erhaltenen Transkriptionsergebnisse mit denen anderer, durch RNA-Polymerase III synthetisierter RNAs eindeutiger vergleichen zu können, erfolgten mehrere Transkriptionen, wie in Abschnitt 2.15.2. beschrieben, mit 5 µCi (α - 32 P)-UTP (spez. Akt.: 600 Ci/mmol) bei Temperaturen zwischen 20 und 42 °C. Die

weitere Analyse verlief wie in Abschnitt 3.5.1. beschrieben. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt.

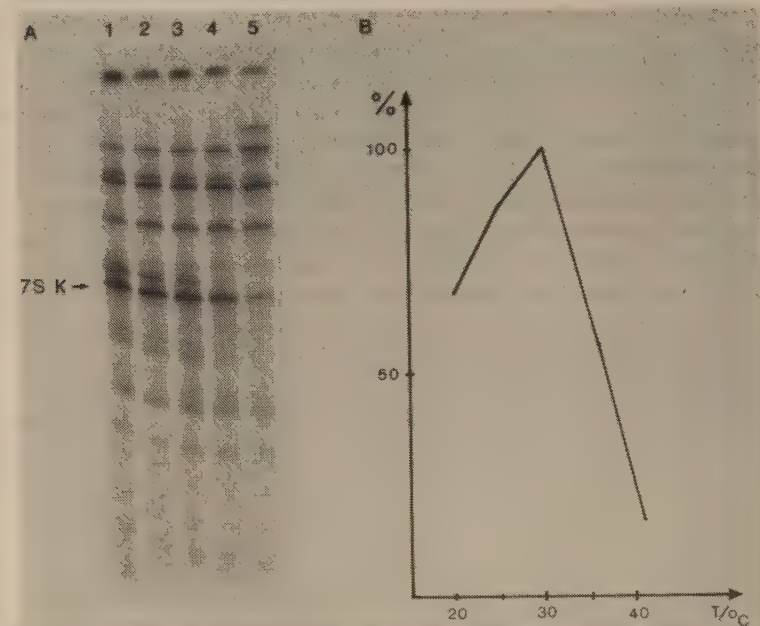


Abb. 21: Bestimmung des Temperatur-Optimums für die Transkription des 7S K RNA Gens mit einem S 100-Extrakt aus Mela Sa-Zellen. Die Transkription erfolgte mit 1.3 µg DNA des Subklons p7SK/132 wie oben beschrieben. Teil A zeigt die Auftrennung der Syntheseprodukte in einem 6Zigen, denaturierenden Polyacrylamid-BM Harnstoffgel. Die verschiedenen Temperaturen waren: 20 °C (Spur 1), 25 °C (Spur 2), 30 °C (Spur 3), 37 °C (Spur 4), und 42 °C (Spur 5). Expositionszeit: 8 Stunden ohne Verstärkerfolie. Im nebenstehenden Diagramm (Teil B) wurden die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen.

Dieses Experimentes zeigt in Übereinstimmung mit dem Wert für Extrakte aus KB-Zellen (Roeder et al., 125, 126), daß das Temperaturoptimum für die Transkription bei 30 °C liegt.

3.6. Einfluß verschiedener DNA-Regionen der 7S K RNA Transkriptionseinheit auf die in vitro Syntheserate der 7S RNA K

3.6.1. Sequenzhomologien in der 7S K RNA Transkriptionseinheit zu anderen RNA-Polymerase III Genen

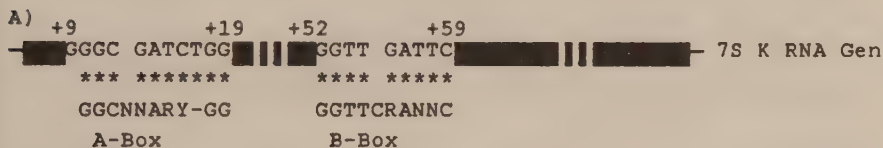
Der Vergleich der Promotorregionen einer ganzen Anzahl von RNA-Polymerase III-Genen (52-61) hat gezeigt, daß diese Kontrollregionen im Gen lokalisiert sind und auf zwei verschiedene Sequenztypen zurückgeführt werden können.

Es handelt sich dabei um den internen Promotor vom tRNA-Gentyp,

der in zwei Blöcke, eine A-Box (Position +9 bis +19) und eine B-Box (Position +50 bis +60) aufgespalten ist und nach Birnstiel et al. (54) die Konsensussequenz TGGCNNAGTGG (A-Box) GGTTTCGANNC (B-Box) bzw. nach Ciliberto et al. (61) die Sequenz RRYNNARYGG (A-Box) GA/TTTCRANNC (B-Box) aufweist. Dabei bedeutet der Buchstabe R Purin, Y Pyrimidin und N eine frei wählbare Base.

Im 5S-Gentyp liegt dagegen eine zusammenhängende, interne Kontrollregion ("ICR", Position +50 bis +83) vor, deren Sequenz AGCCAAGCAGGGTCGGGCTGG-TTAGTAGTTGG (Brown et al., 59) als eine Kombination zweier A-Boxen (Position +50 bis +72) mit einer C-Box (Position +73 bis +83) angesehen werden kann (G. Ciliberto, 61).

Die Identifizierung derartiger Kontrollregionen im 7S K RNA Gen ist in Abb. 22 dargestellt, wobei als Konsensussequenz für die A-Box des tRNA-Gentyp die Mischsequenz GGCNNARYGG benutzt wurde.



Abgel. Konsensussequenz f. Promotoren v. tRNA-Gentyp

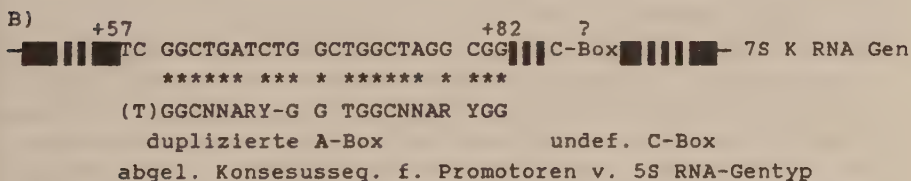


Abb. 22: Zur Konsensussequenz von bekannten RNA-Polymerase III-Genen homologe Sequenzen im 7S K RNA Gen. Teil A zeigt die Homologie zum Promotor des tRNA-Gentyps. In Teil B ist der Vergleich der Strukturelemente der "ICR" mit denen im 7S K RNA Gen dargestellt. Homologe Sequenzen im 7S K RNA Gen sind durch Sterne verdeutlicht.

Eine eindeutige Identifizierung des internen 7S K RNA Promotors aufgrund nur von Sequenzhomologien zu einer Konsensussequenz war nicht möglich. So lassen sich für die A-Box drei verschiedene Positionen finden, zum einen bei Position +9 (Abb. 22, Teil A), dann bei Position +60 und schließlich bei Position +72 (Abb. 22, Teil B). Dieser Effekt resultiert aber aus der relativ geringen Anzahl festgelegter Basen in der Konsensussequenz. Dagegen ließ sich die B-Box mit relativ guter Übereinstimmung bei Position +50

bis +58 nachweisen, so daß im Zusammenhang mit der A-Box bei Position +9 bis +19 ein vollständiger Promotor wie bei den tRNA-Genen gefunden werden kann.

Allerdings deutet die duplizierte A-Box bei Position +60 bzw +72 auf ein ähnliches Strukturelement wie in der "ICR" des 5S-Gens bei Position +50 hin, obwohl eine direkte Homologie zwischen Sequenzen nicht nachweisbar ist. Auch kann eine entsprechende C-Box wie im 5S-Gen aufgrund von Sequenzhomologien nicht gefunden werden. Daher wurde für die weiteren Analysen zunächst angenommen, daß im 7S K RNA Gen ein interner Promotor vorliegt, wie er auch aus den tRNA-Genen u.a. bekannt ist.

In den 5'-flankierenden Sequenzen lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien gewisse Verwandtschaften zwischen einzelnen RNA-Polymerase III Genen erkennen (Abb. 23). Dabei liegt diese Verwandtschaft bei den menschlichen 7S Genen für die K-RNA und L-RNA (68, 132) relativ ausgeprägt vor (Abb. 23).

	-40	-30	-20	-10	-1
7S K RNA	AGATTTTCCTTCAGGTTTATA	TAGCTTGT	GCGCCGCCTGGGTACCTC		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
7S L RNA	AACTGCCCTGCAGCTTC	TAGTAGCTTTTCGAGC	GTCTCCG	AC	C

Abb. 23: Sequenzvergleich zwischen den 5'-flankierenden Regionen der 7S K RNA und der 7S L RNA-Transkriptionseinheit. Homologe Sequenzbereiche sind durch Sterne hervorgehoben.

Ein ähnlich hoher Verwandtschaftsgrad der 5'-, das 7S K RNA Gen flankierenden Region läßt sich auch mit der des tRNA^{Arg}-Gens aus Drosophila m. nachweisen (nicht gezeigt). Dagegen finden sich bei dem Vergleich dieser Region mit der anderer RNA-Polymerase III Gene nur wenige, etwa 8-10 bp lange Sequenzhomologien, die darüber hinaus immer von Vergleich zu Vergleich verschiedene Positionen betreffen.

Dieser Effekt resultiert möglicherweise daraus, daß bis auf das Gen für die 7S L RNA alle übrigen Gene aus anderen Organismen stammten.

3.6.2. Isolierung von Mutanten mit Deletionen im 5'-flankierenden Bereich des 7S K RNA Gens

Im Gegensatz zu der früheren Auffassung, daß die für die Transkription eines RNA-Polymerase III Gens notwendigen Sequenzbereiche alle im Gen enthalten sind, haben die Untersuchungen von Ullu et al. (136) zur 7S L RNA gezeigt, daß dort die 5'-flankierenden Sequenzbereiche zwischen den Positionen -28 und -37 die

Transkriptionsrate modulieren und zwar so, daß ihr Fehlen zu einer Verminderung der Transkriptionsrate auf etwa 5% führen. Derartige Untersuchungen konnten jetzt auch für das 7S K RNA Gen durchgeführt werden.

Dazu wurde die 5'-flankierende Region von der Bam HI-Restriktionsschnittstelle an in Richtung auf das Gen verkürzt. Diese Verkürzung erfolgte am einfachsten mit der Exonuklease Bal 31. Für die entsprechende Reaktion wurden, wie in Abschnitt 2.11.2. beschrieben, 105 µg Plasmid-DNA des Subklons p7SK/132 mit 50 U des Enzyms Bam HI restringiert, die Verdauung durch die Analyse eines Aliquots des Ansatzes auf einem 1.2%igen Agarosegel überprüft, und der gesamte Ansatz von 170 µl Gesamtvolumen mit 7.5 U Bal 31 versetzt. Um die entsprechenden Verkürzungen bis zu maximal 650 bp mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erhalten, wurden nach 2.5, 3, 3.5, 4 und 4.5 Minuten bei 37 °C Aliquots von 34 µl Volumen entnommen, sofort auf 20 mM EGTA gebracht und auf Eis bis zum Ende der Reaktion aufbewahrt. Die vereinigten Aliquots wurden dann phenolisiert (s. Abschnitt 2.2.2.), mit dem Enzym Eco RI restringiert, die überhängenden Enden aus der Bal 31- und der Restriktionsverdauung mit Klenow-Enzym in stumpfe Enden überführt und die DNA-Fragmente in einem 1.3%igen Agarosegel aufgetrennt.

Der Bereich von 600-900 bp wurde in 20 Fraktionen zu je etwa 15 bp ausgeschnitten, die in den Gelstücken enthaltene DNA nach der Methode von Tautz et al. (s. Abschnitt 2.11.3.) eluiert und in die Sma I-Restriktionsschnittstelle des pUC 8-Vektors einkloniert (s. Abschnitt 2.12.3.). Die Überprüfung der Klon erfolgte mit den Restriktionsenzymen Acc I und Eco RI, da die insertierte DNA dabei sowohl freigesetzt als auch gleichzeitig zerlegt wurde. Aus den entstehenden Subfragmenten konnte dann sowohl auf die Orientierung der insertierten DNA geschlossen werden als auch auf die Länge der, das Gen am 5'-Terminus flankierenden Sequenz. Von den 16 überprüften Klonen wurden aufgrund dieser Merkmale 9 verschiedene ausgewählt und die insertierte DNA direkt im pUC 8-Plasmid nach der Methode von Sanger et. al (124) sequenziert. Dazu wurde die Plasmid-DNA je nach der ermittelten Orientierung der insertierten DNA entweder mit dem Enzym Bam HI oder mit dem Enzym Eco RI linearisiert, so daß die 5'-flankierende Region des 7S K RNA Gens immer direkt einer der beiden, zu dem jeweiligen "Sequenzierungsprimer" homologen Plasmidsequenzen benachbart war. Nach der Hybridisierung des entsprechenden Sequenzierungsprimers erfolgte die weitere Analyse wie in Abschnitt 2.14.2. beschrieben.

Abb. 24 zeigt, in welchem Ausmaß die 5'-flankierende Region des

7S K RNA Gens in den verschiedenen Klonen erhalten blieb. So reicht diese Region bei dem Klon pδ5.1 bis zur Position -17, bei pδ5.3 bis -2, bei pδ6.1 bis -23, bei pδ6.4 bis -65, bei pδ7.1 bis -28, bei pδ7.2 bis -42, bei pδ7.4 bis -57, bei pδ8.4 bis -67 und bei pδ9.2 bis zur Position -111.

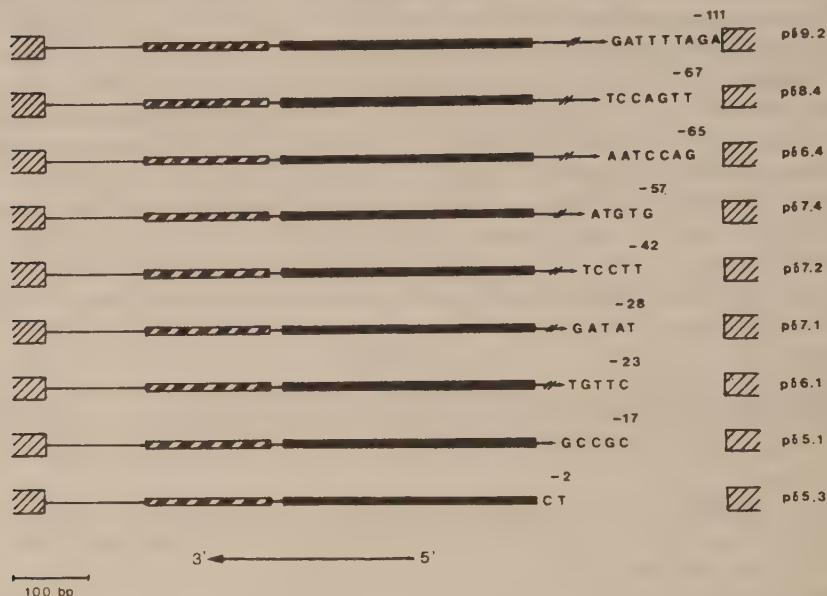


Abb. 24: Sequenzanalyse der ausgewählten Plasmid-Klone pδ5.1, pδ5.3, pδ6.1, pδ6.4, pδ7.1, pδ7.2, pδ7.4, pδ8.4 und pδ9.2. Die Analyse erfolgte wie im Text beschrieben. Es sind dabei immer nur die letzten bis zum Beginn der Deletion angegeben, wobei die Position des Deletionsstartpunktes immer auf das Initiationsnukleotid des 7S K RNA Gens bezogen wurde.

Als weitere Deletionsmutante wurde aus dem Klon p7SK/132 der Subklon p7SK/88 erzeugt (nicht gezeigt), bei dem die stromauf liegende 5'-flankierende Sequenz durch Restriktion mit dem Enzym Pst I (s. Abb. 12/B) ab der Position -247 deletiert wurde. Dieser neue Subklon mit der Bezeichnung p7SK/88 diente zur Überprüfung, ob möglicherweise auch weiter stromauf liegende Kontrollregionen existieren, die die Transkription dieses Gens beeinflussen können.

3.6.3. Transkriptionsverhalten der im 5'-flankierenden Bereich des 7S K RNA Gens deletierten Sequenzen

Der Einfluß der 5'-flankierenden Region des 7S K RNA Gens auf dessen Expression wurde durch in vitro Transkription der kovalen

geschlossenen, zirkulären Plasmid-DNA der in Abschnitt 3.6.1. beschriebenen Deletionsmutanten mit S⁻100 Extrakt (s. Abschnitt 2.15.1.) untersucht. 1.3 µg Plasmid-DNA wurden, wie in Abschnitt 2.15.2. beschrieben, in Gegenwart von 5 µCi (α-³²P)-UTP transkribiert. Die Syntheseprodukte ließen sich in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel auftrennen und durch Autoradiographie nachweisen (Abb. 25/A).

Infolge der auftretenden Transkriptionsnebenprodukte ließ sich die Menge an gebildeter 7S K RNA nur dadurch relativ einfach bestimmen, daß die relative Signalintensität für die 7S K RNA auf dem Röntgenfilm mit Hilfe eines Mikrodensitometers bestimmt und deren Abhängigkeit von der Länge der 5'-, das Gen flankierenden Sequenz in einem Diagramm veranschaulicht wurde (Abb. 25/B).

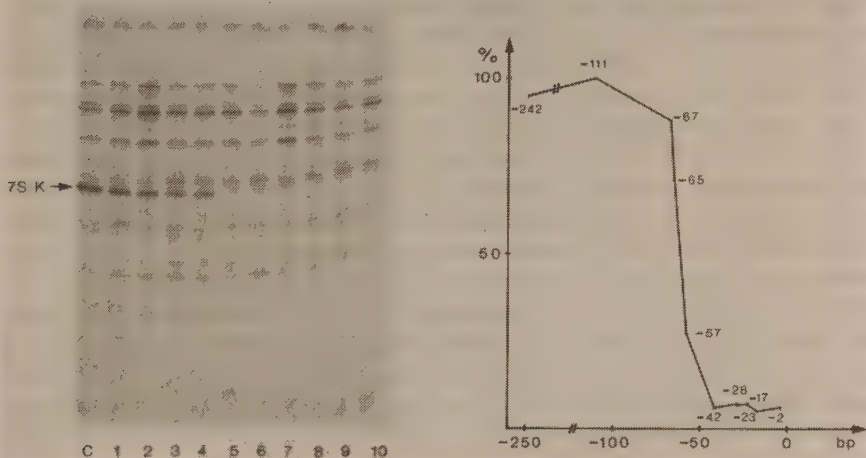


Abb. 25: In vitro Transkription der "5'-Deletionsmutanten" des Subklons p7SK/132. Dabei zeigt Teil A die Autoradiographie der in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgetrennten in vitro Transkriptionsprodukte der jeweiligen Subklone. In den einzelnen Spuren sind die Syntheseprodukte der Deletionsmutanten wie folgt zuzuordnen: p7SK/132 (Spur 1), p7SK/88 (Spur 2), p89.2 (Spur 3), p88.4 (Spur 4), p88.4 (Spur 5), p87.4 (Spur 6), p87.2 (Spur 7), p87.1 (Spur 8), p86.1 (Spur 9), p85.1 (Spur 10) und p85.3 (Spur 11). Expositionszeit: 16 Stunden ohne Verstärkerfolie. In Teil B ist die Abhängigkeit der relativen Signalintensität aus der neusynthetisierten 7S K RNA in Abhängigkeit von der Länge der, das 7S K RNA Gen flankierenden Sequenz (in bp) dargestellt.

Diese Analyse ergab, daß die das 7S K RNA Gen flankierende Sequenz nicht nur modulierende Eigenschaften aufweist, sondern nahezu als "Promotorsequenz" agiert, da bei der Deletion stromab bis zur Position -42 die Transkription des 7S K RNA Gens vollständig zum Erliegen kommt (Abb. 25/A, Spuren 4 bis 6).

Ein derartig drastischer Einfluß der 5'-flankierenden Sequenzbe-

reiche ist für Gene, die durch RNA-Polymerase III transkribiert werden, bislang unbekannt, obwohl näherungsweise ein ähnlicher Effekt bei der Deletion der 5'-flankierenden Sequenzen des menschlichen 7S L RNA Gens beobachtet wird (136). Nach den Aussagen von Ullu et al. ist dort aber der Einfluß des 5'-flankierenden Bereiches nicht so ausgeprägt, wie für das 7S K RNA Gen beobachtet, da die Transkription bei diesem Gen kontinuierlich mit der schrittweisen Deletion der 5'-flankierenden Sequenzen auf etwa 5-10% der Wildtypsyntheserate absinkt. Weiterhin deutet diese Analyse darauf hin, daß stromauf von Position -247 keine weiteren regulatorischen Sequenzen lokalisiert sein sollten, da bei der Transkription der Klone p7SK/132 und p7SK/88 keine meßbaren Unterschiede hinsichtlich der Syntheserate für die 7S K RNA nachgewiesen werden konnten (Abb. 25, Spur 1 und 2).

Obwohl noch etwa 40 bp 5'-flankierende Sequenz zwischen dem Initiationsnukleotid des 7SK RNA Gens und den Vektorsequenzen bei der ersten nicht mehr transkribierbaren Deletionsmutante erhalten sind, kann das Erliegen der Transkription ab dieser Mutante möglicherweise nicht auf den Einfluß einer diskreten 5'-flankierenden Sequenz zurückgeführt werden. Es wäre auch denkbar, daß durch die Deletionen Vektorsequenzen, die als Transkriptionseinhibitoren wirken könnten (136), dem Gen so benachbart werden, daß eine artifizielle Kontrollsequenz vorgetäuscht würde.

Diese Vermutung trifft aber nicht zu, da der Austausch der 5'-flankierenden Region des Gens gegen die des Pseudogens ebenfalls zur Inaktivierung der 7S K RNA-Transkriptionseinheit führt (s. Abschnitte 3.6.4. und 3.6.5.).

Demgemäß muß ein wesentliches Kontrollelement für die Transkription des 7S K RNA Gens gerade in dem hier analysierten 5'-flankierenden DNA-Bereich lokalisiert sein.

Die Zuordnung der Transkriptionsrate des K-Gens zu den Deletionsstartpunkten in den verschiedenen Klonen zeigt weiterhin, daß der notwendige Sequenzbereich aus diesem experimentellen Ansatz relativ genau auf die Positionen -67 bis -42 eingegrenzt werden kann (Abb. 26).

Ein Vergleich dieser 25 bp langen Sequenz der mit der, für das 7S RNA L Gen entscheidenden Region bei -28 bis -37 (136), zeigte, daß in diesem Sequenzbereich keine Homologien nachweisbar waren. Das Ergebnis überrascht um so mehr, da offensichtlich der für die 7S K RNA Transkription notwendige Bereich trotz der ausgeprägten Verwandtschaft beider 5'-flankierender Regionen nicht mehr in den Homologiebereich mit eingeschlossen ist.

Da die zur Transkription des 7S K RNA Gens notwendige Sequenz

darüber hinaus keine Entsprechung in den übrigen, 5'-flankierenden Bereichen des 7S L-Gens findet, resultiert daraus, daß die Expression beider Gene voneinander verschieden reguliert werden muß. Ebenso treten keine Sequenzhomologien dieser 25 bp langen Region mit den 5'-flankierenden Regionen anderer RNA-Polymerase III-Gene (136, 137) auf.

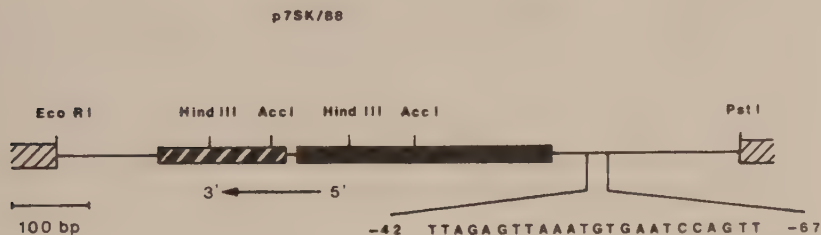


Abb. 26 zeigt den zur Transkription des 7S K RNA Gens notwendigen Sequenzbereich in der das Gen 5'-flankierenden Region. Obwohl die experimentellen Daten eine genauere Eingrenzung auf den Bereich von -57 bis -65 bzw. -67 zulassen, wurde darauf verzichtet, weil die Densitometrische Bestimmung der Signalintensität erst bei der Position -42 einen Restwert von etwa 8% ergab.

Diese Sequenz (3'-TTAGAGTTGAAATGTGAATCCAGTT-5') ist sehr AT-reich (68%), ganz im Gegensatz zum AT-Gehalt des Gens (42%). Aus diesen Ergebnissen folgt aber unmittelbar, daß die Transkription des 7S K RNA Gens von mindestens einem weiteren Proteinfaktor, außer den bisher beschriebenen, abhängt. Dies ist Gegenstand neuer Untersuchungen, die aber alle auf der Isolierung der notwendigen Transkriptionsfaktoren aus dem S-100 Extrakt beruhen.

3.6.4. Isolierung von Rekombinanten aus Teilen der 7S K RNA-Transkriptionseinheit und des Klonen pHK/VI

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluß der 5'-flankierenden Sequenzen des 7S K RNA Gens auf dessen Transkriptionsrate führten zur Konstruktion der folgende Mutanten, deren erfolgreiche Transkription die Bedeutung der 5'-flankierenden Region für das 7S K RNA Gen besonders betonen würde.

Um auszuschließen, daß die Inaktivierung des Gens bei der schrittweisen Deletion seiner 5'-flankierenden Sequenzen auf den dadurch zunehmenden Einfluß der räumlich angenäherten Vektor-DNA zurückführbar ist, wurde die gesamte 5'-flankierende Region des Gens ab der Sau 3A-Restriktionsschnittstelle bei Position +13 gegen die 5'-flankierende Region des Pseudogens im Subklon pHK/VII

ab der dort ebenfalls vorhandenen Sau 3A-Restriktionsschnittstelle ausgetauscht und dieser neue Klon mit der Bezeichnung M₁ (s. Abb. 27) durch Restriktionsanalyse identifiziert.

Bei dem Subklon phK/VII handelt es sich um das sequenzierte, 791 bp lange Hind III-Hind III-Fragment mit dem Pseudogen aus dem Plasmidklon phK/VI (s. Abschnitt 3.1.2.). Dieses Konstrukt diente zugleich als Kontrolle bei der Transkription der folgenden Konstrukte.

Für RNA-Polymerase III-Transkriptionseinheiten wurden bislang nur interne Promotorregionen beschrieben, die alle innerhalb etwa der ersten 100 bp nach dem Initiationsbasenpaar (52-61) lokalisiert sind. Ein derartiger Promotor konnte im 7S K RNA Gen aufgrund von Sequenzhomologien zu einer Konsensussequenz nicht eindeutig zugeordnet werden (s. Abschnitt 3.6.1.), obwohl zunächst ein tRNA-Gen-ähnlicher Promotortyp, bestehend aus A- und B-Box bei den Positionen +9 bis +19 bzw. +52 bis +59, angenommen wurde. Der Vergleich dieser Region des 7S K RNA Gens mit der des Pseudogens im Subklon phK/VI bzw. phK/VII zeigte, daß diese Sequenzen konserviert waren. Da weiterhin insgesamt die ersten 110 bp des Pseudogens bis auf einige wenige mit den entsprechenden des Gens übereinstimmten, wurde angenommen, daß der interne Promotor im Pseudogen erhalten war. Unter der Voraussetzung, daß die Inaktivierung des 7S K RNA Gens bei der Deletion der 5'-flankierenden Region nicht auf die dadurch angenäherten Vektorsequenzen zurückgeführt werden kann, wäre erst die 5'-flankierende Sequenz des 7S K RNA Gens für dessen Authentizität verantwortlich.

In diesem Fall könnte ein Pseudogen dadurch in eine intakte Transkriptionseinheit überführt werden, wenn seine genomische 5'-flankierende Sequenz gegen die des Gens ausgetauscht wird.

Für eine derartige Aktivierung eines Pseudogens wurden die drei Konstrukte aus den Klonen p7SK/88 und phK/VII erzeugt, die in Abb. 27 mit den Bezeichnungen M₂-M₄ dargestellt sind. Auch hier konnten Restriktionsschnittstellen benutzt werden, die sowohl im Gen als auch im Pseudogen vorhanden waren. Es handelt sich um die Sequenzen des Enzyms Sau 3A bei den Positionen +13 und +63 im Gen bzw. +11 und +61 im Pseudogen sowie um die des Enzyms Acc I bei der Position +188 sowohl im Gen als auch im Pseudogen. Für die Mutante M₂ wurde daher die 5'-flankierende Region des Pseudogens bis zur Position +11 im Pseudogen gegen die entsprechende Region des Gens ausgetauscht, wobei letztere aus der insertierten DNA des Klons p7SK/88 von der Pst I-Erkennungssequenz an bis zur Position +13 im Gen besteht (Abb. 27/A). Entsprechend wurde für die Mutante M₃ (Abb. 27/A) die 5'-flankierende Region und die 5'-Hälfte des Pseudogens bis zur Position +61 gegen die ent-

sprechende Region des Gens, d.h., dort bis zur Position +63, ausgetauscht. Schließlich erfolgte für die Mutante M₄ (Abb. 27/A) ein Austausch der 5'-flankierenden Region und der 5'-Hälfte des Pseudogens bis zur Position +188 gegen die entsprechende Sequenz des Klons p7SK/88.

Alle bisher erzeugten Konstrukte basierten auf der Annahme, daß die zur Transkription notwendigen internen Kontrollregionen im Pseudogen konserviert sind. Dies entspricht aber nicht der Realität, da im Pseudogen zumindest das Terminationssignal (144), i. e. die Sequenz TCTTTT, fehlt. Daher könnte eine möglicherweise nicht erfolgte Reaktivierung des Pseudogens nicht nur auf die vorhandenen Basenaustausche in den anderen Regionen des Pseudogens als in den vermuteten Promotorbereichen, sondern auch auf fehlende Sequenzen zurückgeführt werden. Um daher ausschließen zu können, daß ein negatives Reaktivierungsergebnis nicht auf fehlenden Sequenzen aus der 3'-Hälfte des Gens beruht, wurde die Sequenz von der Position +13 bzw. +63 bis zur Position +188 im Gen gegen das entsprechende Fragment aus dem Pseudogen ausgetauscht. Die bei diesem Austausch verwendeten Restriktionschnittstellen sind mit den oben genannten Erkennungssequenzen der Enzyme Sau 3A und Acc I identisch. Insgesamt wurden drei Konstrukte erzeugt (Abb. 27/B).

Während bei den Mutanten M₅ und M₆ ein DNA-Fragment aus der Restriktion mit den Enzymen Sau 3A an der Position +13 bzw. +63 und Acc I an der Position +188 im Gen gegen das entsprechende Fragment aus dem Pseudogen ausgetauscht wurde, erfolgte bei der Mutante M₇ die Deletion des DNA-Fragments aus der Restriktion mit dem Enzym Sau 3A an den Positionen +13 und +63 im Gen. Mit diesem Konstrukt sollte überprüft werden, ob in diesem DNA-Fragment der vermutete interne Promotor lokalisiert war.

Da zur Erzeugung dieser Konstrukte partielle Restriktionsverdauungen notwendig waren, mußte zunächst die Vektor-DNA von der insertierten, genomischen DNA abgetrennt werden. Dazu wurden je 50 µg der in die Subklone p7SK/88 bzw. pHK/VII insertierten DNA mit 50 U des Restriktionsenzym Pvu II aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten, in einem 0.8%igen Agarosegel von der Vektor-DNA abgetrennt und aus dem Gel eluiert (s. Abschnitt 2.11.5). Ein Herausschneiden der insertierten DNA aus den jeweiligen Subklonen unter Benutzung der Klonierungsschnittstellen war nicht möglich, da dann bei der anschließenden partiellen Restriktionsverdauung mehrere gleich große DNA-Fragmente generiert würden. Die partielle Restriktionsverdauung erfolgte mit jeweils 25 µg Fragment-DNA und 15 U des Enzyms Sau 3A für maximal 60 Minuten bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 45 µl, wobei nach 30, 45 und

60 Minuten je ein 15 μ l Aliquot entnommen wurde. Durch Aufbewahren dieser Aliquots bei -70°C konnte die Reaktion beendet werden. Anschließend wurden die jeweiligen Aliquots vereinigt und die entstandenen Restriktionsfragmente in einem 1.3%igen Agarosegel aufgetrennt.

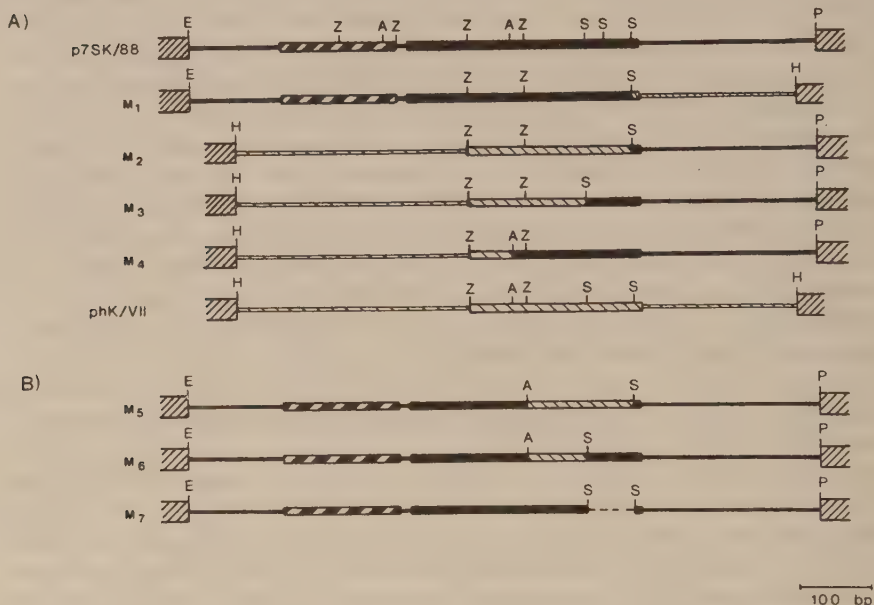


Abb. 27: Restriktionskarten der durch Rekombination von Teilen der Gensequenz mit Teilen der Pseudogensequenz erzeugten Konstrukte. Sequenzbereiche des Klonen p7SK/88 sind schwarz ausgewählt, die aus dem Klon pHK/VI dagegen schraffiert. Bei den einzelnen Mutanten handelt es sich um folgende Konstrukte:

Deletion des 63 bp langen Sau 3A I-Fragmentes im 5'-Bereich des Gens (M_1), Austausch des 125 bp langen Acc I-Sau 3A I-Fragmentes des Gens gegen das entsprechende des Pseudogens (M_2), Austausch des 175 bp langen Acc I-Sau 3A I-Fragmentes des Gens gegen das entsprechende des Pseudogens (M_3), Austausch der 5'-flankierenden Region des Gens von der Sau 3A I-Erkennungssequenz bei Position +13 bis zur Pst I-Erkennungssequenz gegen die entsprechende Fragment des Pseudogens (M_4), Austausch der 5'-flankierenden Region des Pseudogens von der Acc I-Erkennungssequenz bei Position +188 an gegen das entsprechende Fragment des Gens (M_5), Austausch der 5'-flankierenden Region des Pseudogens von der Sau 3A I-Erkennungssequenz (+61) an gegen das entsprechende Fragment des Gens (M_6), Austausch der 5'-flankierenden Region des Pseudogens von der Sau 3A I-Erkennungssequenz (+11) gegen das entsprechende Fragment des Gens (M_7).

Anschließend wurden die folgenden, für die jeweiligen Konstrukte notwendigen DNA-Fragmente, wie in Abschnitt 2.11.4 beschrieben, aus dem Gel eluiert und die infolge der gewählten Klonierungsstrategie noch an diese Fragmente gekoppelten Vektorsequenzen durch Restriktionsverdauung abgespalten. So wurden alle DNA-Frag-

mente aus dem Klon pHK/VII mit dem Enzym Hind III inkubiert, während bei den DNA-Fragmenten aus dem Klon p7SK/88 danach unterschieden wurde, welche der zur Konstruktion dieses Klon verwendeten Klonierungsschnittstellen der Enzyme Eco RI und Pst I in dem jeweiligen DNA-Stück enthalten war. Zur Abtrennung der Vektoranteile erfolgte eine erneute Gelelektrophorese in einem 1.3%igen Agarosegel. Nach der Elution (s. 2.11.3.) der Fragmente, die zur Konstruktion der Mutanten benötigt wurden, erfolgte die Klonierung in Mehrkomponentenligationsansätzen.

Diese enthielten jeweils die zwei bzw. drei für das entsprechende Konstrukt notwendigen DNA-Fragmente und den zugehörigen pUC 8-Vektor (s. Abb. 27).

Die Identifizierung der erhaltenen Konstrukte erfolgte durch Restriktionsanalyse.

3.6.5. In vitro Transkription der Hybridsequenzen aus Teilen der 7S K RNA-Transkriptionseinheit und des Klonen pHK/VII

Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-flankierenden Region des Gens auf das Pseudogen sowie zum ersten Nachweis einer internen Kontrollregion wurden die in Abschnitt 3.6.4. beschriebenen Konstrukte in vitro mit zellfreiem S-100 Extrakt (s. 2.15.1.) transkribiert.

Dabei mußte berücksichtigt werden, daß in den Konstrukten, in denen das Pseudogen mit der 5'-flankierenden Region des Gens rekombiniert wurde, das Terminationssignal für RNA-Polymerase III-Gene fehlt. Es handelt sich hierbei um die Mutanten M₂ - M₄, deren DNA daher mit Restriktionsenzym Ava II zerlegt wurde, so daß die hybride 7S K RNA-Transkriptionseinheit bei der Position +171 endet. Um einen direkten Vergleich der Transkriptionsraten zu erhalten, wurde auch die DNA der Klone p7SK/88 und pHK/VII mit Ava II zerlegt. Für die Transkription wurden die Restriktionsansätze phenolisiert (s. 2.2.2.) und dreimal mit 2 Volumen Ethanol umgefällt. Für die Analyse der übrigen Mutanten konnte kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA eingesetzt werden.

Je 1.3 µg DNA wurde in Gegenwart von 5 µCi (α-³²P)-UTP transkribiert (s. Abschnitt 2.15.2.), die Syntheseprodukte dann in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 28). Abb. 28/A zeigt eindeutig, daß bei der Transkription der Mutanten M₂ - M₄ (Spuren 3 - 5) weder ein definiertes noch ein effizientes Syntheseprodukt entsteht, das entsprechend kleiner als die 7S K RNA ist.

Da das erwartete "run off"-Transkript mit der Größe von 171 nt

nicht nachzuweisen ist, kann daraus nur gefolgert werden, daß die Reaktivierung des Pseudogens nur durch den Austausch der 5'-flankierenden Region gegen die des Gens offensichtlich nicht möglich ist.

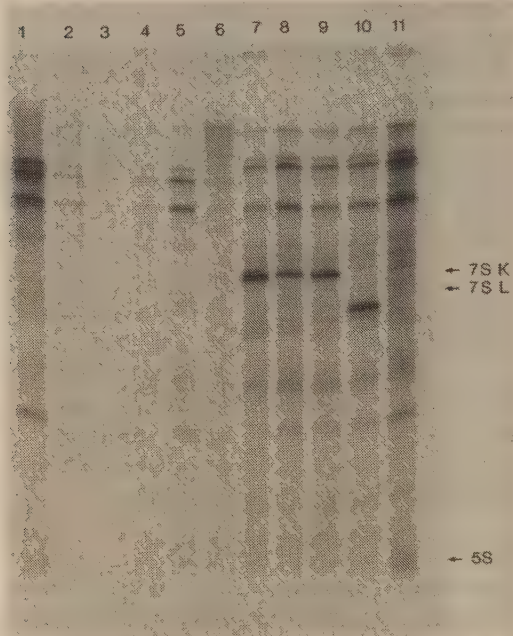


Abb. 28: In vitro Transkription von Hybridsequenzen aus Teilen der 7S K RNA Transkriptionseinheit und des Klonen pHK/VII. Die Konstruktion dieser Mutanten erfolgte wie in Abschnitt 3.6.5. beschrieben. Zur Transkription wurden die verschiedenen Plasmid-DNAs wie oben beschrieben vorbereitet und unter den Standardbedingungen (s. Abschnitt 2.15.2.) transkribiert. Die Syntheseprodukte konnten in einem 6Zigen, denaturierenden Polyacrylamid-BM Harnstoffgel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Die verschiedenen, analysierten Proben in den einzelnen Spuren waren: Restriktion des Klonen pHK/VII mit Ava II (Spur 1), Restriktion des Klonen M₂ mit Ava II (Spur 2), Restriktion des Klonen M₂ mit Ava II (Spur 3), Restriktion des Klonen M₂ mit Ava II (Spur 4), Restriktion des Klonen M₂ mit Ava II (Spur 5), Restriktion des Klonen p7SK/88 mit Ava II (Spur 6), Plasmid-DNA des Klonen p7SK/88 (interner Längensstandard für die K- u. L-RNA, s. Abb. 13, Spur 7), Plasmid-DNA des Klonen M₂ (Spur 8), Plasmid-DNA des Klonen M₂ (Spur 9), Plasmid-DNA des Klonen M₂ (Spur 10), Plasmid-DNA des Klonen pHK/VI (interner Längensstandard für die 5S RNA, Spur 11). Expositionszeit 16 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Es zeigt sich allerdings, daß auch die authentische 7S K RNA-Transkriptionseinheit nicht mehr transkribiert werden kann, wenn sie bei der Position +171 endet (Spur 6). Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß durch die Restriktion mit dem Enzym Ava II DNA-Sequenzen aus der 7S K RNA-Transkriptionseinheit entfernt werden, die in der 3'-Hälfte der Transkriptionseinheit lokalisiert und für die korrekte Transkription dieses Gens verantwortlich sind. Dieser Befund wird durch das in Abb. 28/B dargestellte Ergebnis erhärtet, da der Austausch der 5'-Hälfte des Gens gegen das entsprechende DNA-Fragment aus dem Pseudogen keinen signifikanten Einfluß auf die Transkriptionsrate hat (Spuren 8 und 9). Obwohl durch diesen Austausch eine Reihe von "Mutationen" in das Gen eingeführt werden, entspricht das erhaltene Transkript bezüglich seiner Länge der authentischen K-RNA (Spur 7). Somit sind die Basenaustausche im Pseudogen nicht dafür verantwortlich, daß eine Expression dieses Pseudogens weder in vitro noch in vivo erfolgt.

Überraschenderweise bleibt die Deletion des Sau 3A-Fragments zwischen den Positionen +13 bis +63 ohne Einfluß (Spur 10), obwohl dabei der aufgrund von Sequenzhomologien zwischen den Positionen +9 bis +59 vermutete interne Promotor entfernt wurde. Da durch diese Deletion nur die ersten 6 bp einer ebenfalls über Sequenzhomologien identifizierbaren "ICR" vom 5S RNA-Gentyp entfernt wurden und außer der mit dieser Deletion korrespondierenden Transkriptverkürzung kein weiterer, signifikanter Einfluß auf die Synthese zu beobachten ist (Spur 10), ist zu vermuten, daß in diesem Gen eine bislang unbekannte interne Kontrollregion für die Transkription notwendig ist.

Schließlich bestätigt die Inaktivierung (Spur 2) des Gens durch den Austausch seiner 5'-flankierenden Region gegen die des Pseudogens die in Abschnitt 3.6.3. aufgestellte Theorie, daß in dem flankierenden DNA-Bereich ein wesentliches Kontrollelement für die Transkription des 7S K RNA Gens lokalisiert ist, da die Vektorsequenzen in diesem Konstrukt (M₁) über 150 bp vom Gen entfernt sind, die korrekte Transkription aber nur etwa 70 bp der authentischen 5'-flankierenden Region benötigt (s. Abschnitt 3.6.3.).

Da die effiziente Transkription des hier eingesetzten Pseudogens nur dadurch möglich wurde, daß sowohl seine 5'-flankierende Region gegen die des Gens ausgetauscht als auch die fehlenden 3'-Sequenz addiert wurde, liegt es nahe zu vermuten, daß für die Transkription dieses Genes offensichtlich mehrere Kontrollelemente notwendig sind. Eines davon ist im 5'-flankierenden Bereich des Gens lokalisiert (s. Abschnitt 3.6.3.), die übrigen befinden sich sehr wahrscheinlich in der 3'-Hälfte der 7S K RNA-Transkriptionseinheit.

3.6.6. "Run-off" Transkription von, im 7S K RNA Gen zerlegten DNA-Fragmenten

Der einfachste Ansatz zur Identifizierung von Kontrollregionen im 3'-Bereich der 7S K RNA-Transkriptionseinheit basiert auf der in vitro Transkription von DNA-Fragmenten des Klonen p7SK/88, die durch Zerlegen des Gens in 3'-Richtung hinter der Position +171 bei intakter 5'-Region entstehen. Diese konnten durch die Restriktion der Plasmid-DNA mit dem Enzym Pvu II und jeweils einem der folgenden erzeugt werden: Taq I, Ava II, Acc I, Hind III, Hae II und Dde I. Dadurch konnte die Transkriptionseinheit, wie in Abb. 29 dargestellt, am 3'-Terminus unterschiedlich verkürzt werden.

Dazu wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA des Klonen p7SK/88 , wie in

Abschnitt 2.11.1 beschrieben, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zerlegt. Zur Kontrolle auf die Vollständigkeit der Verdauung erfolgte mit 0.7 µg der eingesetzten Plasmid-DNA die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente in einem 1.3%igen Agarosegel. Die übrige Plasmid-DNA wurde phenolextrahiert (s.

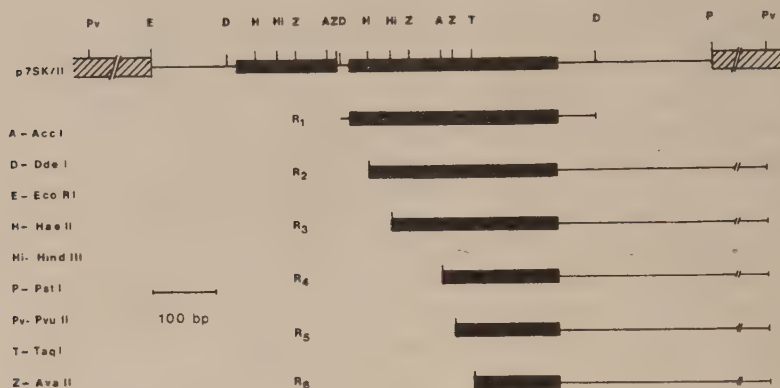


Abb. 29: Zur "run-off"-Transkription des 7S K RNA Gens eingesetzte Restriktionsfragmente. Die Enzyme wurden dabei nach dem Kriterium ausgesucht, daß das Gen von seinem 3'-Terminus her immer weiter in Richtung 5'-Terminus verkürzt wurde. Das Dde I-Fragment (-60 bis +347) wurde zusätzlich ausgewählt, weil es das vollständige 3'-Ende des Gens besitzt und auch nahezu die gesamte 5'-flankierende Kontrollregion, so daß hier in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.6.2. mindestens 30-50% der ursprünglichen Syntheserate erreicht werden sollte. Die Längen der kodierenden Bereiche sind: 331 bp (Dde I), 301 bp (Hae II), 269 bp (Hind III), 188 bp (Acc I), 171 bp (Ava II) und 139 bp (Taq I).

Abschnitt 2.2.2.) und zur in vitro Transkription (s. Abschnitt 2.15.2.) mit S-100 Extrakt (s. Abschnitt 2.15.1.) in Gegenwart von 5 µCi (α-³²P)-UTP eingesetzt. Die Syntheseprodukte ließen sich in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel auftrennen und durch Autoradiographie nachweisen (Abb. 30). Die Autoradiographie der Syntheseprodukte zeigt, daß die Transkription der Fragment-DNA zu einer RNA in der Größe der 7S K RNA führt, deren Syntheserate aber erheblich geringer als die der K-RNA ist. Dieses Syntheseprodukt stammt aber sehr wahrscheinlich aus Resten von nicht im Gen geschnittenen DNA-Fragmenten, da ein vollständiges Transkript aus der, am 3'-Ende verkürzten Matrize nicht möglich ist. In den Spuren 3-7 könnte möglicherweise ein der jeweiligen Verkürzung entsprechendes Transkript (s. Pfeile) sichtbar sein, wobei dieses vermutete, verkürzte "run-off" Transkript wahrscheinlich nur mit einer relativ geringen Syntheserate

produziert wird. Dadurch könnte das erwartete Transkript unter den vielen anderen Syntheseprodukten nur schwer nachweisbar sein.

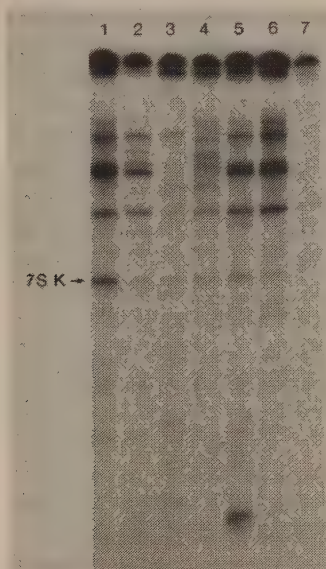


Abb. 30: "Run-off"-Transkription der in Abschnitt 3.5.6 beschriebenen Restriktionsfragmente des Klon p7SK/88. Zur Transkription wurden jeweils 1.3 µg mit den jeweiligen Enzymen zu mehr als 95% zerlegte Plasmid-DNA mit 20 µl 5-100 Extrakt (s. Abschnitt 2.15.1.) in Gegenwart von 5 pCi (α - 32 P)-UTP, wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben, bei 30 °C inkubiert und weiter verarbeitet. Die Syntheseprodukte konnten in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgetrennt werden. Die in den einzelnen Spuren analysierten Proben waren:
 Restriktion mit Pvu II (Spur 1), Restriktion mit Pvu II und Dde I (Spur 2), Restriktion mit Pvu II und Taq I (Spur 3), Restriktion mit Pvu II und Ava II (Spur 4), Restriktion mit Pvu II und Acc I (Spur 5), Restriktion mit Pvu II und Hind III (Spur 6) und Restriktion mit Pvu II und Hae II (Spur 7). Die Verwendung von Pvu II erfolgte zur Isolierung eines definierten Ausgangsfragmentes.
 Expositionszeit: 14 Stunden ohne Verstärkerfolie.

Allerdings zeigt auch die Transkription des DNA-Fragments R₁, das nur das 7S K Gen und die ersten 60 bp der 5'-flankierenden Region enthält, ebenfalls eine deutlich reduzierte Syntheserate (Spur 2), aber im Gegensatz zu den vermuteten Signalen der "run-off" Transkripte ist das der 7S K RNA entsprechende Transkript (s. Pfeil) durch eine diskrete Bande identifizierbar. Die in diesem Fall reduzierte Transkriptionsrate ist aber korrelierbar mit den Ergebnissen über den Einfluß der 5'-flankierenden Region des Gens auf dessen Transkription. Somit erfolgt die Transkription dieses DNA-Fragmentes erwartungsgemäß reduziert, während die Syntheserate der im Gen zerlegten DNA-Fragmente vergleichsweise stark absinkt, obwohl gerade bei diesen Fragmenten die 5'-flankierende Region mit dem Genanteil verknüpft blieb. Dieses Ergebnis impliziert aber, daß möglicherweise eine weitere, für die Transkription des 7S K Gens notwendige Kontrollregion in 3'-Richtung wahrscheinlich zumindest hinter der Ava II-Erkennungssequenz, aber noch vor der Dde I-Schnittstelle zu vermuten ist.

Die Identifizierung dieser zusätzlichen 3'-Kontrollregion ist daher Gegenstand zur Zeit vorgenommener, weiterführender Untersuchungen, wobei gleichzeitig geklärt werden soll, wo der eigentliche interne RNA-Polymerase III-Promotor dieses Gens lokalisiert ist.

4. Diskussion

Obwohl die 7S K RNA wie alle übrigen zur Zeit bekannten von RNA-Polymerase III synthetisierten RNAs in relativ großen Mengen aus dem Zytoplasma eukaryoter Zellen isoliert werden kann (Abb. 3/A), ließ sich mit radioaktiv markierter RNA als spezifische Sonde ein funktionelles 7S K-Gen aus einer menschlichen Genbibliothek nicht isolieren. Dies lag darin begründet, daß im Genom eine Reihe, mit diesem Gen verwandter Sequenzen auftritt (Murphy et al., 43; eigene, nicht publizierte Daten; 131), wobei die Gesamtzahl dieser im Genom verteilten 7S K RNA Pseudogene auf etwa 500-1000 Kopien geschätzt wurde. Der Wert ließ sich aus den 114 erhaltenen positiven Signalen ableiten, die bei der früheren Durchmusterung einer anderen Genbank aus 140000 ausplattierten Phagen erhalten wurden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die als Sonde eingesetzte authentische 7S K RNA nur mit einer geringen spezifischen Aktivität radioaktiv markiert werden kann, so daß Phagenklone, die nur langsam wachsen, wegen des hohen Anteils an nicht markierter RNA durch die Hybridisierung nicht mehr nachzuweisen sind. Die identifizierten Klone repräsentierten daher sicherlich nur einen Teil der in der Genbibliothek enthaltenen, zur 7S K RNA homologen Sequenzen.

Darüber hinaus stimmte die abgeschätzte Anzahl an Pseudogenen mit den von Murphy et al. (43) beschriebenen 3000 Kopien pro haploidem Genom recht gut überein, wobei diese höhere Reiterationsfrequenz aus der Signalintensität bei "Southern Blots" von genomischer DNA abgeleitet wurde.

Für den Nachweis potentieller Genkandidaten, die einer Population mittelrepetitiver, leicht divergenter genomischer Sequenzen angehören, sind zwei Faktoren von wesentlicher Bedeutung, nämlich die Spezifität der eingesetzten Sonde und die Hybridisierungsbedingungen, unter denen der Nachweis dieser Kandidaten erfolgt.

Die Klonierung von cDNA-Kopien einer polyadenylierten 7S K RNA bot die Möglichkeit, eine spezifische Sonde herzustellen, die nach der Selektion eines diskreten cDNA-Klons schnell in ausreichenden großen Mengen präpariert werden kann.

Ein wesentliches Kriterium für die Auswahl der Hybridisierungsbedingungen basiert darauf, daß Pseudogene von der verwendeten cDNA-Sonde wegen der verringerten Homologie zur 7S K RNA möglichst nicht erkannt werden sollen. Da sich die kodierenden Regionen von K- und L-Gen hinsichtlich ihrer Größe und ihres GC-Gehaltes nicht wesentlich voneinander unterscheiden, konnten die gleichen Bedingungen wie bei der Isolierung des 7S L RNA Gens verwendet werden (Ullu et al., 68, D. Zöphel, 132). Die Son-

de, die unter diesen Bedingungen nahezu nur noch mit sich selbst hybridisierte, konnte daher nur K-Sequenzen mit etwa 95% und größerer Homologie erkennen.

Die Amplifikation der Phagen auf den Hybridisierungsfiler bot schließlich eine gute Möglichkeit, auch bei langsam wachsenden Phagen zum Nachweis ausreichende DNA-Mengen auf den Filtern zu immobilisieren.

Die Kombination dieser Faktoren führte schließlich zur Reduktion der infolge der Pseudogene zu erwartenden Anzahl von etwa 3000 Signalen pro 600000 Phagen auf 18 Signale, die 5 verschiedenen Klonen zugehörig waren.

Die folgenden Ergebnisse belegen, daß die im Subklon p7SK/132 isolierte, genomische DNA aus dem identifizierten Phagen ein vollständiges, in vivo exprimiertes Gen für die 7S K RNA trägt: Der Vergleich der klonierten, genomischen Sequenz mit der cDNA für die 7S K RNA aus HeLa S₃ (s. Abschnitt 3.2.4., Murphy et al., 44) zeigt, daß die Homologie zwischen den beiden Sequenzen 100% beträgt. Eine ähnlich hohe Homologie besteht bis auf vier geänderte Basen zu der 7S K RNA, die von Reddy et al. (45) aus Rattenzellen (Novikoff Hepatoma) isoliert und sequenziert wurde. Die auftretenden Basenaustausche resultieren dabei entweder aus der evolutionären Divergenz zwischen Mensch und Ratte oder sie reflektieren eine mögliche Mikroheterogenität bei den exprimierbaren 7S K RNA Genen.

Einen weiteren, wesentlichen Nachweis für die Identität der genomischen DNA-Sequenz mit einem zugehörenden, funktionellen Gen lieferten die in vitro Transkriptionsanalysen. Hier sei besonders darauf hingewiesen, daß eine spezifische in vitro Transkription sogar schon mit Phagen-DNA als Matritze erreicht wurde. Diese Methode wurde aus mehreren Gründen der üblicherweise an dieser Stelle vorgenommenen Charakterisierung von Phagenklonen durch Restriktionskartierung und anschließende Sequenzierung vorgezogen. So besitzt der kodierende Bereich des 7S K RNA Gens eine Gesamtlänge von 331 bp und trägt außer den Restriktionsenzymen Acc I, Hind III und Hae II keine weiteren mit ähnlich selten auftretenden Erkennungssequenzen. Der Nachweis dieser Restriktionschnittstellen in einer kodierenden Sequenz dieser Länge durch Hybridisierung ist auf der Stufe der Phagen-DNA zum einen nur für die Enzyme Acc I und Hind III möglich, zum anderen liefert die Restriktionskarte infolge der inhärenten Fehler von ± 500 bp keine eindeutigen Ergebnisse. Aussagefähigere Hinweise für ein funktionelles Gen erfordern die Subklonierung und die Sequenzanalyse jedes identifizierten DNA-Fragments mit einem putativen Gen. Eine derartige Vorgehensweise muß aber bei der Existenz einiger

tausend Pseudogene (43) als sehr aufwendig angesehen werden, wenn auch infolge der Selektion der Phagen unter extrem hohen Hybridisierungsstringenzen hier nur 5 Genkandidaten erhalten wurden.

Wie die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigen, führt die in vitro Transkription der Phagen-DNA der Genkandidaten zu wesentlich aussagekräftigeren Ergebnissen. Zwar existieren in den Phagenklonen RNA-Polymerase III Transkriptionseinheiten, die erheblich effizienter als das 7S K Gen transkribiert werden, aber keines dieser Transkripte, außer der K-RNA, hybridisiert unter hoher Stringenz an eine 7S K-cDNA (Abb. 10).

Dieser Effekt, daß einige Sequenzen eines genomischen Phagenklons derartig häufig als Transkriptionsmatrize fungieren, ist auf die Synthese unter in vitro Bedingungen zurückzuführen. Diese erfolgt meist suboptimal für das Gen, da zunächst über dessen optimale Ionenbedingungen zur Transkription auf dieser Stufe keine Informationen vorliegen. Dagegen können die gleichen Bedingungen die Transkription anderer Sequenzen erheblich begünstigen.

Weiterhin werden zur Transkription 15-20 Kb genomischer DNA und 30 Kb Phagen-DNA eingesetzt, so daß die Konzentration an Promotoren aus den 7S K RNA-Transkriptionseinheiten relativ gering ist. Wie die verschiedenen phagenspezifischen Transkriptspektren zeigen, werden in Übereinstimmung mit verschiedenen Autoren (58, 138-142) in vitro von RNA-Polymerase III auch andere Sequenzen außer den Genen effizient transkribiert, wenn sie über einen unter diesen Bedingungen aktiven Promotor verfügen. Zu diesen Sequenzen gehören sicherlich die der Alu-Familie, deren Mitglieder im Säuger genom in einem Abstand von 5-10 Kb auftreten (142, 143). Ein Teil dieser Sequenzen wird gerade erst unter in vitro Bedingungen transkribiert (58, 138, 143), aber infolge des fehlenden Terminationssignals entstehen Transkripte unterschiedlicher Länge, die von der Position einer als Stoppsignal erkannten Sequenz, einem Tetramer aus Thymidinresten im nicht kodierenden Strang (144), abhängt. Durchschnittlich sind also wenigstens 2-3 dieser Transkripte aus der Passagier-DNA zu erwarten. Diese Faktoren erschweren die Identifizierung der gesuchten RNA wesentlich, da eine Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren auftritt, die in vivo möglicherweise auch infolge der Chromatinstruktur (145, 159, 160) nicht gegeben ist.

Diese Konkurrenz wird umso bedeutsamer, je homologer die transkribierbaren Syntheseeinheiten in einem Phagenklon zueinander sind und je größer die Abweichungen von den genspezifischen Optimumbedingungen der Transkription sind. Daher müssen wahrscheinlich z. B. für das 7S L-Gen, das den Mitgliedern der Alu-Familie

geraden in der internen Promotorregion stark ähnelt, wesentlich mehr Transkriptionsansätze in einem Hybrid-Select Experiment eingesetzt werden als für das 7S K-Gen (D. Zöphel, 132). Berücksichtigt man diese Faktoren, so erscheint die in vitro Transkription auf der Ebene der X-Phagen als ein sehr brauchbares Verfahren zur Identifizierung von funktionellen RNA-Polymerase III-, möglicherweise auch von RNA-Polymerase II-Genen. Durch die Anwendung dieser sehr schnellen Methode als zusätzliches Selektionskriterium konnte, nach der Klassifizierung in Phagen mit gleicher Passagier-DNA, die weitere Analyse schließlich auf den einen Klon beschränkt werden, der in dem Hybridisierungs-Selektions Experiment ein K-homologes Transkript lieferte, das bereits durch einfache Gelanalyse identifizierbar war (Abb. 10).

Auch nach der Subklonierung zeigen die Transkriptionsanalysen neben der K-RNA weitere, prominente Signale durch andere Transkripte, die ebenfalls von RNA-Polymerase III synthetisiert werden (Abb. 14/A). Diese Transkripte bestätigen die die obigen Aussagen über, nur in vitro aktive RNA-Polymerase III Transkriptionseinheiten, da offensichtlich auch Vektorsequenzen als brauchbare Matrize fungieren können. Daß hier Vektorsequenzen transkribiert wurden, ließ sich daraus ableiten, daß, hinsichtlich der Passagier-DNA völlig verschiedene Subklone ein identisches Transkriptspektrum zeigten (Abb. 14).

Ein weiterer Hinweis für die Identität dieser in vitro, mit der DNA des Subklons p7SK/132 synthetisierten RNA mit der 7S K RNA aus HeLa S₃-Zellen besteht darin, daß dieses Transkript in zwei verschiedenen Gelsystemen die gleiche Mobilität besitzt wie die in vivo gebildete 7S K RNA. Darüber hinaus hybridisiert auch sie mit der isolierten 7S K-cDNA des Klons pcK/III und kann dadurch aus den Produkten eines in vitro Transkriptionsansatzes herausselektioniert werden.

Weiterhin erfolgt die Synthese von K- und L-RNA in einem zellfreien Extrakt (Abb. 14/B) mit vergleichbarer Effizienz, obwohl die Transkriptionsrate des 7S K RNA Gens nur etwa 1/3 von der des 7S L RNA Gens beträgt. Diese Differenz könnte entweder unterschiedliche Promotoreffizienzen reflektieren oder sie ist einfach auf die Klonierung in unterschiedliche Vektoren zurückführbar. Schließlich zeigt die durchgeführte "Fingerprint-Analyse", daß nach der Verdauung mit Ribonuklease T₁ die Oligonukleotidmuster der in vivo synthetisierten 7S K RNA und des in vitro gebildeten Produkts der genomischen K-Sequenz identisch sind.

Diesem authentischen 7S K RNA Gen folgt am 3'-Terminus in einem Abstand von 19 bp eine Sequenz, die mit der 7S K RNA eng verwandt

ist. Dieses Pseudogen ist überraschenderweise am 5'-Terminus um 167 bp verkürzt und wird weiterhin durch eine Sequenz von 19 bp vom eigentlichen Gen getrennt, die am 3'-Terminus des Pseudogens wiederholt wird. Dieses Strukturelement der sog. "direct repeats" ist charakteristisch für eine Vielzahl eukaryoter Pseudogene und deutet auf einen ähnlichen Insertionsmechanismus der DNA-Fragmente wie bei transposablen Elementen hin (72).

Allerdings kann die Beschränkung des "direct repeats" auf diese 19 bp als sehr willkürlich angesehen werden, da das anschließende Pseudogen die exakte Repetition der 3'-Hälfte des Gens darstellt. Daher beträgt die Gesamtlänge der Duplikation, bestehend aus dem Pseudogen und der an dessen 3'-Terminus anschließenden 19 bp langen Sequenz 179 bp. Dieser Wert entspricht der Repetitionslänge von 181 bp der Basen in der 5S Transkriptionseinheit aus X.laevis und stimmt auffällig unter Berücksichtigung der jeweiligen Spezies-spezifischen Abweichungen mit der Länge der beiden DNA-Windungen um ein Nukleosom, bestehend aus dem "Core" und dem Histon H₁ überein.

Da hier der 3'-terminale Bereich des Gens repetitiert wurde, deutet sowohl diese Repetitionslänge als auch die Tatsache, daß außer den 19 bp keine weiteren 3'-flankierenden Sequenzen des Gens bei der Integration dieses Pseudogens konserviert wurden, auf einen vollständig anderen Mechanismus für die Entstehung dieses Pseudogens hin als auf den für die übrigen Pseudogene, deren typischer Vertreter auch das Pseudogen im Klon pHK/VI darstellt. Dessen Sequenz gehört strukturell zu einer Gruppe von Pseudogenen, die von den sn-RNA-Genen (van Arsdell et al., 70) und den 7S L RNA Pseudogenen (Ullu und Weiner, 68) gebildet werden, da die kodierende Sequenz um 87 bp am 3'-Terminus verkürzt ist, eine Reihe interner Mutationen enthält und von zwei 21 bp langen, direkten Sequenzwiederholungen flankiert wird.

Das Fehlen einer AT-reichen Region am 3'-Terminus dieser auch als Retrotransposons (72) auffaßbaren Sequenz läßt im Zusammenhang mit der 3'-terminalen Verkürzung auf einen Entstehungsmechanismus für dieses Pseudogen schließen, der dem ähnelt, der von Bernstein et al. (146) am Beispiel eines Pseudogens für die snRNA U₂ bzw. von Ullu et al. (68) für ein 7S L Pseudogen beschrieben wurde. Durch Rückfaltung der RNA zu einer spezifischen Sekundärstruktur kann der 3'-Terminus der RNA mit internen Regionen einen Doppelstrang bilden, der als interner "Primer" für die cDNA-Synthese fungieren kann, so daß die 3'-terminalen Sequenzbereiche schon bei der Synthese des ersten Stranges verlorengehen.

Dagegen ähnelt das, dem Gen am 3'-Ende folgende Pseudogen infolge der 5'-Verkürzung strukturell zwei 7S L Pseudogenen, die von Ullu

et al. (68) als sekundäre Pseudogene klassifiziert wurden. Allerdings treten neben den flankierenden "direct repeats" keine zusätzlichen Basen unbekannten Ursprungs in der K-homologen Sequenz auf, so daß es als sehr unwahrscheinlich erscheint, daß diese Sequenz ein sekundäres Pseudogen darstellt.

Möglicherweise kann für die K-homologe Sequenz des Klons p7SK/132 ein Entstehungsmechanismus postuliert werden, der das benachbarte Gen direkt, also ohne RNA-Zwischenstufe, mit einbezieht. So könnte diese Genduplikation durch einen der Rekombinationsprozesse während der DNA-Replikation erfolgen. In diesem Zusammenhang scheint auch der Entfernung von 179 bp der im Pseudogen duplizierten Basen zu ihren Originalen im Gen besondere Bedeutung zuzukommen, so wäre z. B. ein mit der Chromatinstruktur in Verbindung stehender Entstehungsmechanismus denkbar.

Dieses, am 5'-Terminus um 167 bp verkürzte Pseudogen zeigt weiterhin im repetitierten, kodierenden Bereich eine absolute Homologie zum 7S K Gen. Im Vergleich zu anderen bekannten Pseudogenen (154-157), besonders zu denen anderer sn-RNA-Gene (Van Arsdell et al., 70; Ullu und Weiner, 68) ist diese Konservierung sehr ungewöhnlich, da nach der 5'-Verkürzung dieses Pseudogen inaktiviert vorliegt. Diese Inaktivierung impliziert aber einen fehlenden Selektionsdruck, so daß wie bei den übrigen Pseudogenen eine derartige Modifikation essentieller Sequenzen durch Mutationen oder Deletionen erlaubt ist.

Daher kann die Genduplikation nur entweder vor relativ kurzer Zeit erfolgt sein oder dieses Pseudogen unterliegt doch einem evolutionären Selektionsdruck.

Unabhängig von dieser Frage liefern die in dieser Arbeit vorgestellten Pseudogene einen weiteren Beweis dafür, daß das Säuger-genom eine relativ große Zahl von Sequenzen enthält, die als Retrotransposons bezeichnet werden können und dokumentieren, daß es einen bedeutenden Rückfluß genetischer Information von der RNA zurück in die chromosomale DNA gibt. So kann ein Genom bis zu 10% aus derartigen Sequenzen bestehen (71, 147).

Dieser Prozess erfordert aber die Existenz einer reversen Transkriptase, die in menschlichen Zellen nicht nachweisbar ist, bei der Maus möglicherweise in virusähnlichen, sog. intrazisternalen A-Partikeln lokalisiert sein könnte (148, 149). Andererseits könnten die Mitglieder der sog. L1-Familie an der Verbreitung der Pseudogene beteiligt sein (150), da diese langen, repetitiven Sequenzen (LINES) mehrere, offene Leserahmen enthalten, die für Rekombinationsproteine kodieren könnten.

Eine weitere Frage ist die, ob Pseudogene bzw. repetitive DNA-Elemente funktionellen Charakter besitzen oder ob sie "parasitäre"

DNA (151, 152) darstellen, die durch Mutationen die Evolution der inaktivierten Gene ermöglichen.

In diesem Zusammenhang erschien es berechtigt, in dem direkt auf das Gen folgenden Pseudogen ein funktionelles Element für die Transkription des 7S K Gens zu vermuten, da bislang auch derartig verkürzte Pseudogene weder so hochkonserviert noch so nahe am entsprechenden Ursprungsgen lokalisiert gefunden wurden.

Zur Klärung dieser Fragestellung konnten infolge Zeitmangels leider keine eindeutigen Experimente mehr durchgeführt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse könnten möglicherweise darauf hindeuten, daß entweder in der 3'-Hälfte des Gens selbst oder vielleicht sogar in dem 3'-flankierenden Bereich eine Sequenz lokalisiert ist, die essentiell für die effiziente Transkription dieses Gens zu sein scheint (Abb. 30). Diese Aussage resultiert zum einen daraus, daß selbst ein am 3'-Ende verkürztes Gen weniger effizient transkribiert wird als das intakte Gen.

Zum anderen gelang es offensichtlich nicht, ein Pseudogen durch Austausch der 5'-flankierenden Sequenzen zu aktivieren (Abb. 28), da für eine definierte Termination auch diese Konstrukte im kodierenden Bereich zerlegt werden mußten.

Aus diesen Ergebnissen ließe sich aber ableiten, daß zur effizienten Transkription dieses Gens auch Sequenzen notwendig sind, die in der 3'-Hälfte des Gens lokalisiert sind. Dieses Verhalten ähnelt dem, das von Söll et al. (137) für das tRNA^{Arg}-Gen aus *Drosophila m.* beschrieben wurde, steht aber im direkten Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (60, 153). Die dort eingesetzten 3'-Deletions- und Insertionsmutanten führten nicht zur Herabsetzung der Gentranskription, sondern dort wurde durch die Synthese ein, infolge des veränderten Terminationssignals längeres Transkript erzeugt, das aber mit der gleichen Syntheserate wie die originale tRNA gebildet wurde. Allerdings wurden jene Ergebnisse bei der Transkription von RNA-Polymerase III Genen in einem nicht homologen System erhalten, während die hier vorgestellten Analysen, wie auch die von Söll et al., mit einem homologen Extrakt durchgeführt wurden.

Diese Resultate implizieren nämlich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Söll et al., daß für die effiziente Transkription dieses Gens neben den anderen Faktoren möglicherweise auch die korrekte Termination sichergestellt sein muß.

Die zur Zeit vorgenommenen, weiterführenden Versuche zur Identifizierung dieser 3'-liegenden Sequenz zeigen allerdings, daß die Deletion des 3'-liegenden Pseudogens die Syntheserate der 7S K RNA unter standardisierten in vitro Bedingungen nicht verändert; trotzdem könnten aber Zusammenhänge zwischen dem ver-

gleichsweise niedrigen DNA-Optimum (Abb. 20) für die Transkription und diesem hochkonservierten Pseudogen bestehen, obwohl es am 5'-Terminus so stark verkürzt ist.

Bemerkenswert erscheint auch die vergleichsweise ausgeprägte Homologie von 74% der ersten 42 bp in der 5'-flankierenden Region des 7S K RNA Gens mit denen in der 5'-flankierenden Region des 7S L RNA Gens. Diese Homologie zwischen den 5'-flankierenden Sequenzen des K- und des L-Gens deutet möglicherweise darauf hin, daß zwischen diesen beiden Regionen eine evolutionäre Verwandtschaft besteht. Dabei könnten die relativ häufig auftretenden Basenaustausche die, im Laufe der Evolution entstandene, unterschiedliche Regulation beider Gene reflektieren.

In einem gewissen Gegensatz zu der Homologie der 5'-flankierenden Sequenzen steht deren Einfluß auf die Syntheserate während der Transkription. Auch hier zeigt sich ein außergewöhnliches Verhalten der 7S K-Transkriptionseinheit, das allerdings nicht so unerwartet auftritt wie der Einfluß der 3'-terminalen Sequenzbereiche. Erstaunlich bleibt aber, daß eine korrekte Transkription des gesamten Gens ohne 5'-flankierende Sequenzen nicht möglich ist. Der dazu notwendige, 5'-flankierende Bereich des 7S K Gens umfaßt die Basenpaare der Positionen -42 bis -67, da eine nachweisbare Transkription nur dann gelingt, wenn mehr als die ersten 42 5'-flankierenden Basenpaare erhalten sind. Die weitere Verkürzung der 5'-flankierenden Region in Richtung auf das Gen führt zum vollständigen Abbruch der korrekten Transkription dieses Gens, so daß die notwendigen Sequenzen in dem Bereich von -42 bis -67 lokalisiert werden können (Abb. 26). Allerdings kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Sequenz direkt an das Gen anschließen kann oder ob sie durch einen "Spacer" von etwa 42 bp vom Gen getrennt werden muß, um eine "Wildtyp-Transkriptionsrate zu induzieren.

Dieses Verhalten ist in einer derart extremen Form bislang für kein anderes RNA-Polymerase III-Gen beschrieben, auch wenn für die 7S L Transkription von Ullu und Weiner (136) gezeigt wurde, daß nach der schrittweisen Deletion der 5'-flankierenden Sequenzen die Syntheserate ab der Position -37 analog dazu bis auf 5% bei der Position +2 im Vergleich zum Wildtyp-Gen absinkt. Dieses Absinken der Syntheserate erfolgt dort aber kontinuierlich, bis die Deletion das Initiationsnukleotid des 7S L Gens erreicht.

Ein entsprechender Effekt kann für das 7S K Gen nicht beobachtet werden, da dort die Initiationsrate abrupt bei Erreichen der Position -57 auf etwa 30% und nach Erreichen der Position -42 auf etwa 8% absinkt. Ein derartiges Verhalten impliziert möglicher-

weise sogar einen weiteren Transkriptionsfaktor, dessen Bindungsstelle im 5'-flankierenden Sequenzbereich zwischen den Positionen -42 bis -67 lokalisiert ist.

Infolge dieses überraschend starken Einflusses der 5'-flankierenden Region des 7S K RNA Gens auf dessen Transkription kann ein interner Promotor, der im 7S K Gen aufgrund der Sequenzhomologien (Abb. 22) identifiziert wurde, bei der korrekten Transkription des menschlichen 7S K Gens nicht die Bedeutung besitzen, die ihm infolge der Ergebnisse für andere RNA-Polymerase III-Gene (Ciliberto et al., 61; Birnstiel et al., 54) zugeordnet wurde. Darüber hinaus liefert die Deletion des Sau 3A-Fragments durch die Restriktion bei den Positionen -12 bis -63 einen Hinweis darauf, daß in diesem Gen keine interne Kontrollregion vom tRNA-Genotyp vorhanden ist. Obwohl nämlich ein derartiger Promotor der Sequenzhomologie nach zwischen den Positionen +9 und +59 lokalisiert sein sollte, wird das Gen offensichtlich korrekt transkribiert, wobei die entsprechend verkürzte RNA effizient gebildet wird.

Dieser Effekt führt aber zu der Vermutung, daß für dieses Gen eine "Interne Kontrollregion (ICR)" wie bei den 5S Genen aus *Xenopus* (Brown et al., 59) zu erwarten sein sollte.

Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologien in der DNA-Sequenz des 7S K RNA Gens zu der Sequenz der "C-Box" des 5S RNA Gens erscheint es aber unwahrscheinlich, daß der Faktor TFI_{IIA}, der für das 5S Gen (49) spezifisch ist, ebenfalls für die Transkription des K-Gens benötigt wird. Daher könnte diese fehlende Sequenzhomologie zur "C-Box" des 5S RNA Gens auf die Existenz von mindestens einem weiteren Faktor hindeuten, der möglicherweise ähnlich wie TFI_{IIA}, zu den sog. "Fingerproteinen" (160) gehören könnte. Letztere Vermutung wird dadurch unterstützt, daß die 7S K RNA Transkriptionseinheit ein vergleichsweise großes RNA-Polymerase III Gen darstellt und, setzt man einen oder nur wenige intern bindende Faktoren voraus, so können sie sich nur dann wie der 5S Gen spezifische Faktor TFI_{IIA} (165) über größere Bereiche dieses Gens erstrecken, wenn wenigstens einer wie TFI_{IIA} eine lineare Grundstruktur aufweist. So besteht TFI_{IIA} z. B. sehr wahrscheinlich aus einer Serie von wiederholten Domänen (161-163) mit α -helikaler Struktur. Diese mutmaßlichen DNA-Bindungscentren des Proteins (164) ragen fingerartig aus der linearen Grundstruktur heraus. Dabei zerfällt TFI_{IIA} in drei funktionelle Domänen, von denen zwei Transkriptionsrate direkt beeinflussen, nämlich die, die am 5'-Ende der "ICR" bindet und eine weitere, nicht an die DNA bindende Region (166). Die Dritte, die am 3'-Ende der "ICR" bindet, dient wahrscheinlich nur der Stabilität

des DNA-Protein-Komplexes und beeinflusst nur indirekt die Syntheserate (166). Möglicherweise reflektiert das Transkriptionsverhalten des am 3'-Ende verkürzten 7S K RNA Gens die Existenz einer Bindungsstelle, deren Fehlen den DNA-Protein-Transkriptionskomplex dann in einer ähnlichen Form destabilisiert wie dies für die im 3'-Bereich der "ICR" des 5S RNA Gens bindende Domäne von TFIID postuliert wird (166).

Insgesamt bestätigt gerade dieses Zusammenspiel der kodierenden K-Sequenz mit den flankierenden, genomischen DNA-Regionen während der Transkription, daß die hier vorgestellte Sequenz tatsächlich ein authentisches, menschliches Gen für die 7S K RNA darstellt. Für das Gen der menschlichen 7S K RNA ergeben sich also die folgenden Strukturmerkmale. Ein interner Promotor könnte eventuell aufgrund von Homologien zu einer Konsensussequenz ab der Position +57 in Form einer "ICR" lokalisiert werden. Die Syntheserate und die korrekte Initiation sind nicht nur von einer intakten 5'-flankierenden Sequenz abhängig, sondern beruhen in gleichem Maße auch auf der Existenz eines 3'-terminalen Bereichs des 7S K Gens. Diese Resultate müssen zunächst durch weitere Experimente abgesichert werden. Dazu nötig wären z. B. Deletionsmutanten, die entweder den internen oder den 3'-terminalen Bereich betreffen. Über den möglicherweise existierenden Einfluß des flankierenden Pseudogens könnte zunächst eine "kompetitive" DNA-Mengenkinetik Aufschluß geben, bei der das Gen allein und in Verbindung mit dem flankierenden Pseudogen transkribiert wird .

Die Überprüfung der aufgrund dieser Experimente erhaltenen Information über die Lokalisierung der Kontrollregionen kann dann durch die Aktivierung von ruhenden 7S K-Pseudogenen erfolgen. Darüber hinaus erfordert die exakte Eingrenzung der für die Transkription notwendigen Regionen "DNase I-Footprints". Parallel dazu müßten Mutanten erzeugt werden, deren Basenaustausche nur die jeweilig untersuchte Kontrollregion betreffen. Schließlich kann mit diesem Gen nicht nur der bisher bekannte Teil des Transkriptionsmechanismus für die RNA-Polymerase III überprüft werden, sondern es können mit ihm, infolge seines von bekannten RNA-Polymerase III Genen abweichenden Transkriptionsverhaltens wahrscheinlich weitere bislang unbekannte, genspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

In diesem Zusammenhang wird auch der Vergleich dieses Gens mit dem gleichfalls vorliegenden 7S L Gen (D. Zöphel, 132) von besonderem Interesse sein. Möglicherweise können dabei erste Hinweise auf die Beziehung der Transkriptionsmechanismen von K- und L-Gen durch den Austausch der essentiellen Kontrollregionen, wie z. B. der 5'-flankierenden Regionen, erhalten werden.

5. Zusammenfassung

Mit menschlicher, gelgereinigter 7S K RNA als Matrice wurde eine cDNA synthetisiert und anschließend kloniert, die für nahezu die gesamte RNA kodiert. Diese cDNA-Sonde wurde zur Isolierung eines 7S K RNA Gens aus einer menschlichen Genbibliothek eingesetzt. Das Aufgreifen von Pseudogenen konnte durch die Anwendung hoher Stringenzbedingungen bei der Plaquehybridisierung minimiert werden. Die Unterscheidung des Gens von hochhomologen K-Sequenzen erfolgte durch einen anschließenden, sehr schnellen und aussagekräftigen in vitro Transkriptionsansatz unter RNA-Polymerase III-Bedingungen mit gereinigter Phagen-DNA als Matrice.

Mit diesem zusätzlichen Selektionsverfahren, das auf alle Genkandidaten angewendet wurde, konnte ein Phagenklon identifiziert werden, der das gesamte 7S K RNA Gen beinhaltet. Die Sequenzanalyse ergab, daß sich diesem Gen am 3'-Terminus direkt ein 5'-verkürztes, Pseudogen ohne Basenaustausche anschließt. Dieses 7S K RNA Gen wird in vitro effizient von RNA-Polymerase III transkribiert und liefert ein Transkript, das zur cDNA homolog ist und die gleiche Länge wie die 7S K RNA aufweist. Die Analyse dieses Transkriptes durch "T₁-Fingerprinting" bestätigte die Identität des in vitro Transkripts mit der authentischen 7S K RNA.

Dabei entspricht das Verhältnis aus den in vitro Transkriptionsraten des 7S K Gens und des 7S L Gens dem, das auch in vivo vorliegt. Für dieses funktionelle 7S K RNA Gen wurden die Ionen- und DNA-Optima bestimmt.

Zur Untersuchung der DNA-Bereiche des 7S K Gens, die für die Transkription essentiell sind, wurden verschiedene Mutanten erzeugt. Die schrittweise Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des Gens zeigt, daß die Wildtyp-Transkriptionsrate nur dann gewährleistet ist, wenn die Basen bis zur Position -67 erhalten sind. Neuartig ist, daß bei der weiteren Deletion bis zur Position -42 die Transkriptionsrate schnell reduziert wird und danach vollständig zum Erliegen kommt.

"Run-off"-Transkriptionen deuten darauf hin, daß auch im 3'-terminalen Bereich der gesamten 7S K-Transkriptionseinheit Sequenzen lokalisiert sind, die nur für eine effiziente Transkription essentiell sind.

Die Reaktivierung von nicht transkribierbaren K-Pseudogenen durch Austausch ihrer 5'-flankierenden Regionen gegen die des Gens gelang infolge solcher fehlenden 3'-Bereiche nicht.

Die Deletion des internen, durch Sequenzvergleich identifizierten Promotors vom tRNA-Genotyp zeigte keinen Einfluß auf eine effiziente Transkription.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Darnell J. E., Prog. Nucl. Acids Mol. Biol. (1979), 23, pp. 228-290
- 2 Chamberlin M. J., in "RNA-Polymerase" (R. Losick, M. Chamberlin, eds.), pp. 17-67, Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1976)
- 3 Pribrnow D., in "Biological Regulation and Development" (R. Goldberger, ed.), pp. 250-277, Plenum, New York (1979)
- 4 Rosenberg M., Court D. A. Ann. Rev. Genet. (1979), 13; pp. 319-353
- 5 Gallant J. A., Ann. Rev. Genet. (1979), 13, pp. 393-415
- 6 Roeder R. G., in "RNA-Polymerase" (R. Losick, M. Chamberlin eds.), pp. 285-329, Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1976)
- 7 Paule M. R., Trends Biochem. Sci., (1981), 6, pp. 128-131
- 8 Seifart K. H., Benecke B. J., Eur. J. Biochem., (1975), 53, pp. 293-300
- 9 Attardi G., Trends Biochem. Sci., (1981), 6, pp. 100-103
- 10 Roeder R. J., J. Biol. Chem., (1974), 249, pp. 241-248
- 11 Chambon P., Ann. Rev. Biochem. (1975), 44, pp. 613-638
- 12 Long E. O., Dawid I. B., Ann. Rev. Biochem. (1980), 49, pp. 727-764
- 13 Abelson J., Ann. Rev. Biochem., (1979), 48, pp. 1035-1069
- 14 Perry R. P., Ann. Rev. Biochem. (1976), 45, pp. 605-629
- 15 Benecke B. J., Penman S., Cell (1977), 12, pp. 939-946
- 16 Chambon P., Sci. Am. (1981), 244 (5), pp. 60-71
- 17 Darnell J. E., Nature (1982), 297, pp. 365-371
- 18 Perry R. P., J. Cell. Biol. (1981), 91, pp. 28-38
- 19 Beyer A. L., Miller O. L., McKnight R., Cell (1980), 20, pp. 75-84
- 20 Crick F., Science (1979), 204, pp. 264-271
- 21 Zieve G. V., Cell (1981), 25, pp. 296-297
- 22 Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi Y. C., Ann. Rev. Biochem. (1982), 51, pp. 617-654
- 23 Murphy J. T., Burgess R. R., Dahlberg J. E., Lund E., Cell (1982), 29, pp. 265-274
- 24 Roop D. R., Kristo P., Stumph W. E., Tsai M. J., O'Malley B., Cell (1981), 23, pp. 671-680
- 25 Calvet J. P., Pederson T., Cell (1981), 26, pp. 363-370
- 26 Lerner M. R., Boyle J. A., Stephen M. M., Wolin S. L., Steitz J. A., Nature (1980), 283, pp. 220-224
- 27 Galli G., Hofstetter H., Stunnenberg H. G., Birnstiel M. L., Cell (1983), 34, pp. 823-828

- 28 Miller K. S., Zbrzezna V., Pogo A. O., J. Mol. Biol. (1984)
177, pp. 343-368
- 29 Zieve G., Penman S., Cell (1976), 8, pp. 19-32
- 30 Zieve G., Benecke B. J., Penman S., Biochemistry (1977),
16, pp. 4520-4525
- 31 Reichel R., Benecke B. J., Nucl. Acids Res. (1980), 8,
pp. 225-234
- 32 Weinmann R., Roeder R. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
(1974), 71, pp. 1790-1794
- 33 Weinmann R., Brendler T. G., Raskas H. J., Roeder R. G., Cell
(1976), 7, pp. 557-566
- 34 Rosa M. D., Gottlieb E., Lerner M. R., Steitz J. A., Mol.
Cell. Biol. (1981), 1, 785-796
- 35 Ingles C. J., Beatty B. G., Guialis A., Pearson M. L.,
Crerar M. M., Lobban P. E., Siminovitch L., Buchwald M.,
in "RNA-Polymerase" (R. Losick, M. Chamberlin, eds.), pp.
835-853, Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor (1976)
- 36 Jaehning J. A., Woods P. S., Roeder R. G., J. Biol. Chem.
(1977), 252, pp. 8762-8771
- 37 Gundelfinger E., Saumweber H., Dallendörfer A., Stein H.,
Eur. J. Biochem. (1980), 3, pp. 395-401
- 38 Sklar V. E., Yamamoto M., Roeder R. G., in "RNA-Polymerase"
(R. Losick, M. Chamberlin, eds.), pp. 803-817, Monograph
Series, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
(1976)
- 39 Schultz L. D., Hall R. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
(1976), 73, pp. 1029-1033
- 40 Sklar V. E., Schwartz L. B., Roeder R. G., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. (1975), 72, pp. 348-352
- 41 Sklar v. E., Roeder R. G., J. Biol. Chem. (1976), 251,
pp. 1064-1073
- 42 Sklar v. E., Jaehning J. A., Gage L. P., Roeder R. G., J.
Biol. Chem. (1976), 251, pp. 3794-3800
- 43 Ullu E., Melli M., Nucl. Acids Res. (1982), 10 (7),
pp. 2209-2223
- 44 Murphy S., Altruda F., Ullu E., Tripodi M., Silengo L.,
Melli M., J. Mol. biol (1984), 177, pp. 575-590
- 45 Reedy R., Dale H., Subrahmanyam C. S., Busch H., J. Biol.
Chem. (1984), 259, pp. 12265-12270
- 46 Gitschier J., Wood W., Goralka T. M., Wion K. L., Chen E. Y.,
Eaton D. H., Vehar G. A., Capon D. J., Lawn R. M., Nature
(1984), 312, pp. 326-330
- 47 Ng S. Y., Parker C. S., Roeder R. G., Proc. Natl. Acad. Sci.

- U.S.A. (1979), 76, pp. 136-140
- 48 Segall J., Matsui T., Roeder R. G., J. Biol. Chem. (1980), 255, pp. 11986-11991
- 49 Engelke D. R., Ng S. Y., Shastri B. S., Roeder R. G., Cell (1980), 257, pp. 717-728
- 50 Sprague K. U., Hagenbüchle V., Zuniga M. C., Cell (1977), 11, pp. 561-570
- 51 Grussem W. Seifart K. H., J. Biol. Chem. (1982), 257, pp. 1468-1472
- 52 Hofstetter H., Kressmann a., Birnstiel M. L., Cell (1981), 24, 573-585
- 53 DeFranco D., Schmidt O., Söll D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980), 77, pp. 3365-3368
- 54 Galli G., Hofstetter H., Birnstiel M. L., Nature 1981), 294, pp. 626-631
- 55 Fowlkes D. M., Shenk T., Cell (1980), 22, pp. 405-413
- 56 Akusjärvi G., Mathes M. B., Andersson P., Vennström B., Pettersson U., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980), 77, pp. 2424-2428
- 57 Deininger P. L., Jolly D. J., Rubin C. M., Friedmann T., Schmidt C. W., J. Mol Biol. (1981), 151, pp. 17-33
- 58 Paoletta G., Lucero M. A., Murphy H. M., Baralle F. E., EMBO J. (1983), 2, pp. 691-696
- 59 Sakonju S., Bogenhagen D. F., Brown D. D., Cell (1980), 19, pp. 13-35
- 60 Sakonju S., Brown D. D., Engelke D., Ng S. Y., Shastri B. S., Roeder R. G., Cell (1981), 23, pp. 665-669
- 61 Ciliberto G., Castagnoli L., Cortese R., Curr. Topics. Dev. Biol (1983), 18, pp. 59-78
- 62 Ullu E., Esposito V., Melli M., J. Mol. Biol. (1982), 161, pp. 195-201
- 63 Gurney T., Elicieri G. L., J. Cell. Biol. (1980), 87, pp. 398-403
- 64 Reddy R., Li W. Y., Dale H., Choi Y. C., Nogha K., Busch H., J. Biol. Chem. (1981), 256, pp. 8452-8457
- 65 Gunning P. W., Shooter E. M., Austin L., Jeffrey P. L., J. Biol. Chem. (1981), 256, pp. 6663-6669
- 66 Gunning P. W., Beguin P., Shooter E. M., Austin L., Jeffrey P. L., J. Biol. Chem. (1981), 256, pp. 6670-6675
- 67 Ullu E., Tschudi C., Nature (1984), 312, pp. 171-172
- 68 Ullu E., Weiner A. M., EMBO J. (1984), 3, pp. 3303-3310
- 69 Sharp P. A. Nature (1983), 301, pp. 471-472
- 70 VanArsdell S. W., Denison R. A., Bernstein L. B., Weiner A. M., Manser T., Gesteland R. F., Cell (1981), 26, pp. 11-17

- 71 Rogers J. H., Int. Rev. Cytol., (1985), 93, pp. 231-271
- 72 Rogers J. H., Nature (1983), 301, p. 460
- 73 Puck T. T., Marcus P. J., Cieciura S. J., J. Exp. Med. (1956), 103, pp. 273-284
- 74 Smith J. D., Freeman G., Vogt M., Dulbecco R., Virology (1960), 12, pp. 185-196
- 75 Lenk R., Penman S., Cell (1979), 16, pp. 289-301
- 76 Earle W. R., J. Nat. Cancer Inst. (1943), 4, p.165
- 77 Penman S., J. Mol. Biol. (1966), 17, pp. 117-130
- 78 Palmiter R. D., Biochemistry (1974), 13, pp. 3606-3615
- 79 Maxam A. M., Gilbert W., Methods Enzymol. (1980), 65, p. 799
- 80 Laskey R. A., Mills A. D., Eur. J. Biochem. (1975), 56, pp. 335-341
- 81 Joklik W. K., pers. Mitteilung an Fa. Gibco/BRL
- 82 Gibbs E. L., J. Biol. Chem. (1942), 144, pp. 325-334
- 83 England T. E., Uhlenbeck O. C., Nature (1978), 275, pp. 560-561
- 84 England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. (1980), Methods Enzymol., 65, pp. 65-74
- 85 Birnboim H. C., Doly J., Nucl. Acids Res. (1979), 7, p. 1513
- 86 Ish-Horowicz D., Burke J. F., Nucl. Acids Res. (1981), 9, p. 2989
- 87 Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., in "Molecular Cloning", pp. 90-93, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982)
- 88 Maxam A. M., Gilbert W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1977), 74, pp. 560-564
- 89 Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., in "Molecular Cloning", pp. 113-116, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982)
- 90 Rigby P. W. J., Dieckman M., Rhodes C., Berg P., J. Mol. Biol. (1977), 113, pp. 237-245
- 91 Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1975), 72, pp. 1184-1188
- 92 Sippel A. E., Eur. J. Biochem. (1973), 37, pp. 3731-3740
- 93 Gubler U., Hoffman B. J., Gene (1983), 25, pp. 263-269
- 94 Okayama H., Berg P., Mol. Cell. Biol. (1982), 3, pp. 280-289
- 95 Deng G., Wu R., Nucl. Acids Res. (1981), 9, pp. 4173-4188
- 96 Twigg A. J., Sheratt D., Nature (1980), 283, pp. 216-218
- 97 Peacock S. C., McIver C. M., Monahan J. J., Biochim. Biophys. Acta (1981), 655, pp. 243-250
- 98 Hanahan D., Meselson M., Gene (1980), 10, pp. 63-67
- 99 Denhardt T. D., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1966), 23, pp. 641-646

- 100 Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T.,
Cell (1978), 15, pp. 1157-1174
- 101 Maniatis T., Hardison R. C., Lacey E., Lauer J., O'Connell C.,
Quon D., Sim G. K., Efstradiadis A., Cell (1978), 15,
pp. 687-701
- 102 Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denison-Thomp-
son K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kie-
fer D. C., Moore D. D., Schumm J. W., Sheldon E. L.,
Smithies O., Scscience (1977), 196, pp. 161-169
- 103 Woo S. L. C., Methods Enzymol. (1979), 68, pp. 389 ff.
- 104 Woo S. L. C., Dugaicyzk A., Tsai M. J., Lai E. C., Catterall
J. F., O'Malley B. W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978),
75, pp. 3688-3692
- 105 Benton W. R., Davies R. W., Science (1977), 196, pp. 180-182
- 106 Wahl G. M., Stern M., Stark G. R., Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. (1979), 76, 3683-3687
- 107 Leder P., Tiemeier D., Enquist L., Science (1977), 196,
pp. 175 ff.
- 108 Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Lawhorne L.,
Truber G., Virology (1970), 40, pp. 734-741
- 109 Southern E. M., Methods Enzymol. (1981), 68, pp. 152-176
- 110 Southern E. M., J. Mol. Biol. (1975), 98, pp. 503-517
- 111 Nagamine Y., Sentenac A., Framageot P., Nucl. Acids Res.
(1980), 8, pp. 2453-2460
- 112 Legerski R. J., Hodnett J. C., Gray H. B. jr., Nucl. Acids
Res. (1978), 5, pp. 1445-1457
- 113 Tautz D., Rentz M., Anal. Biochem. (1983), 132, pp. 14-19
- 114 Winberg G., Hammar skjöld M. L., Nucl. Acids Res. (1980), 8,
pp. 213-264
- 115 Dretzen G. M., Bellard P., Sassone-Corsi P., Chambon P.,
Anal. Biochem. (1981), 112, pp. 295-298
- 116 Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., in "Molecular Clo-
ning", p. 94, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor (1982)
- 117 Appleyard R. K., Genetics (1954), 39, pp. 440-452
- 118 Messing J., Crea R., Seeburg P. H., Nucl. Acids Res. (1981),
9, pp. 309-321
- 119 Mandel M., Higa A., J. Mol. biol. (1970), 53, pp. 154-163
- 120 Chaconas G., Van de Sande J. H., Methods Enzymol. (1980),
65, pp. 75-76
- 121 Viera J., Messing J., Gene (1982), 19, pp. 259-268
- 122 Hanahan D., J. Mol. Biol. (1983), 166, pp. 557-580
- 123 Perron C. Y., Viera J., Messing J., Gene (1985), 33,
pp. 103-119

- 124 Sanger F., Nicholson S., Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1977), 74, pp. 5463-5467
- 125 Weil P. A., Segall J. H., Harris B., Ng S.-Y., Roeder R. G., J. Biol. Chem. (1979), 254, pp. 6163-6173
- 126 Dignam J. D., Lebovitz R. M., Roeder R. G., Nucl. Acids Res. (1983), 11, pp. 1475-1489
- 127 Bradford M. M., Anal. Biochem. (1976), 72, pp. 248-254
- 128 Domdey H., Gross H. J., Anal. Biochem. (1979), 93, pp. 321-328
- 129 Brownlee G. G., Sanger F., Eur. J. Biochem. (1969), 11, pp. 395-399
- 130 Silberklang M., Gillum A. M., Raj Bhandary U. L., Nucl. Acids Res. (1977), 4, p. 4091
- 131 Diplomarbeit W. Krüger, Ruhr Universität Bochum (1982)
- 132 Dissertation D. Zöphel, Ruhr Universität Bochum (1986)
- 133 Dingermann T., Sharp S., Appel B., DeFranco D., Mount S., Heiermann R., Pongs O., Söll D., Nucl. Acids Res. (1981), 9, pp. 3907-3918
- 134 Schwartz L. B., Sklar V. E., Jaehning J. A., Weinmann R., Roeder R. G., J. Biol. Chem. (1974), 249, pp. 5889-5897
- 135 Jaehning J. A., Weinmann R., Brandler T. G., Raskas H. J., Roeder R. G., in "RNA-Polymerase" (R. Losick, M. Chamberlin, eds.), pp. 819-834 , Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1976)
- 136 Ullu e., Weiner A. M., Nature (1985), 318, pp. 371-374
- 137 Shaack J., Sharp S., Dingermann T., Burke D. J., Cooley L., Söll D., J. Biol. Chem. (1983), 259, pp. 1461-1467
- 138 Elder J. T., Pan J., Duncan C. H., Weissman S. M., Nucl. Acids Res. (1981), 9, pp. 1171-1189
- 139 Fritsch E. F., Shen C. K. J., Lawn R. M., Maniatis T., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1981), 45, pp. 761-775
- 140 Cheng J. F., Printz R., Callaghan T., Shuey D., Hardison R. C., J. Mol. Biol. (1984), 176, pp. 1-20
- 141 Schmid C. W., Jelinek W. R., Science (1982), 216, pp. 1065-1070
- 142 Jelinek W. R., Schmid C. W., Ann. Rev. Biochem. (1982), 51, pp. 813-844
- 143 Duncan C., Biro P. A., Choudary P. V., Elder J. T., Wang R. C., Forget B. G., de Riel J. K., Weissman S. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1979), 76, pp. 5095-5099
- 144 Bogenhagen D. F. Brown D. D., Cell (1981), 24, pp. 261-270
- 145 Lassar A. B., Hamer D. H., Roeder R. G., Mol. Cell. Biol. (1985), 5, pp. 40-45
- 146 Bernstein L. B., Mount S. M., Weiner A. M., Cell (1983),

- 32, pp. 461-472
- 147 Baltimore D., Cell (1985), 40, pp. 481-482
- 148 Lueders K. K., Kuff E. C. Cell (1977), 12, pp. 963-972
- 149 Burt D. W., Reith A. D., Brammar W. J., Nucl. Acids Res.
(1984), 12, pp. 8579-8593
- 150 Singer M. F., Skowronski J., Trends Biochem. Sci. (1985),
10, pp. 119-122
- 151 Orgel S. E., Crick F. H. C., Nature (1984), 284, pp. 604-606
- 152 Doolittle W. F., Sapienza C., Nature (1980), 284, pp. 601-603
- 153 Carrara G., Segni G. A., Otsuka A., Tochini-Valentini G. P.,
Cell (1981), 27, pp. 371-379
- 154 Denison R. A., Weiner A. M., Mol. Cell. Biol. (1982), 2,
pp. 815-828
- 155 Denison R. A., VanArsdell S. W., Bernstein L. B., Weiner A. M.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1981), 78, pp. 810-814
- 156 Manser T., Gesteland R. F., J. Mol. Appl. Genetics, (1981),
1, pp. 117-125
- 157 Jagadeeswaran P., Forget B. G., Weissman S. M., Cell (1981),
26, pp. 141-142
- 158 Jacq C., Miller J. R., Brownlee G. G., Cell (1977), 12,
pp. 109-120
- 159 Schlissel M. S., Brown D. D., Cell (1984), 37, pp. 903-913
- 160 Vincent A., Nucl. Acids Res. (1986), 14, pp. 4385-4391
- 161 Ginsberg A. M., King B. O., Roeder R. G., Cell (1984), 39,
pp. 479-489
- 162 Brown R. S., Sander C., Argos P., FEBS Lett. (1985), 186,
pp. 271-274
- 163 Rhodes D., EMBO J. (1985), 4, pp. 3473-3482
- 164 Ohlendorf D. H., Matthews B. W., Ann. Rev. Biophys. Bioeng.
(1983), 12, pp. 259-284
- 165 Miller J., McLachlan A. D., Klug A., EMBO J. (1985), 4,
pp. 1609-1614
- 166 Smith D. R., Jackson I. J., Brown D. D., Cell (1984), 37,
pp. 645-652

Lebenslauf

Name	Winfried Krüger
Geburtsdatum/-ort	13. 3. 1958 in Konstanz/Bodensee
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
1964 - 1967	Besuch der Grundschulen in Straubing und Bremen
1967 - 1976	Besuch der Gymnasien in Bremen, Bensberg und Wetter/Ruhr
2.6. 1976	Abschluß der Schulausbildung durch Erwerb des Reifezeugnisses am "Städt. Gymnasium" in Wetter/Ruhr
1976 -1984	Studium im Fach Chemie an der "Ruhr Universität Bochum"
1983 - 1984	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Abteilung Chemie bei Herrn PD Dr. B. J. Benecke
1984 - 1986	Promotion am Lehrstuhl für Biochemie der Abteilung Chemie an der "Ruhr Universität Bochum" bei Herrn PD Dr. B. J. Benecke

